

DESENVOLVIMENTO DE METODOLOGIAS PARA O ISOLAMENTO E CARACTERIZAÇÃO DE PROTEASES OBTIDAS DO LÁTEX DE *TABERNAEMONTANA CATHARINENSIS*.

Camila Ferreira Amaral (PIBIC/CNPq/FA/UEM), Bruna Higashi², Kathielle Luiza Mucellini¹, Regina Aparecida Correia Gonçalves¹ (co - orientador), Arildo José Braz de Oliveira¹ (Orientador), e-mail: ajboliveira@uem.br.

Departamento de Farmácia, ¹ Universidade Estadual de Maringá (UEM), Maringá, PR.

² Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, UEM

Farmácia/Farmacognosia

Palavras-chave: Látex, proteases, proteínas

Resumo

A *Tabernaemontana catharinensis* pertence ao gênero *Tabernaemontana* e a família Apocynacea, sendo uma árvore laticífera. O látex possui uma ampla variedade de proteínas, sendo rico especialmente em enzimas proteolíticas. As proteases constituem um dos mais importantes grupos de enzimas tendo aplicação em diversos setores industriais, tais como na produção de alimentos, detergentes, produtos farmacêuticos e couro. A purificação é uma etapa muito importante para obtenção de enzimas que envolve vários métodos, como precipitação, exclusão por tamanho, cromatografia de troca iônica, por afinidade, entre outros. O objetivo deste projeto foi caracterizar e isolar as proteases obtidas do látex de *T. catharinensis* por meio de pré-purificação por precipitação (acetona) seguida por purificação destas por cromatografia de troca iônica. A concentração de proteínas encontradas no precipitado acetônico foi de 38,21%. Após a purificação por cromatografia por troca iônica – catiônica obteve-se uma fração com 99% de proteínas. Conclui-se que a cromatografia por troca iônica – catiônica foi uma técnica eficaz para a separação de proteínas do látex.

Introdução

A *Tabernaemontana catharinensis* pertence ao gênero *Tabernaemontana* e à família Apocynacea, e é conhecida como "Leiteira" (erva leiteira), sendo uma árvore lactífera comum que cresce em pastagens dos Estados brasileiros de São Paulo e Norte do Paraná (CORREA, 1984).

Os componentes químicos mais comumente presentes no látex são os metabólitos primários como as proteínas (proteases, inibidores de proteases, lecitinas e proteínas de ligação à quitina como a heveína, quitinases, oxidases e outros tipos de proteínas) e metabólitos secundários como os

terpenoides (borracha), alcaloides, glicosídeos cardiotônicos e compostos fenólicos.

As proteases são enzimas que catalisam a hidrólise de ligações peptídicas de proteínas (DALLING, 1986). As proteases derivadas de plantas encontram um uso promissor na área de biotecnologia, de alimentos e devido à sua alta especificidade ao substrato, alta estabilidade em condições extremas, boa solubilidade e atividade sobre uma ampla variedade de pH e temperatura (AMID et al., 2012; MUTHU 2017).

O isolamento ou purificação de uma proteína é uma etapa que precede os estudos de suas características físico-químicas, de sua estrutura 3D e a compreensão de suas propriedades biológicas. Inicialmente, a estratégia de purificação de uma proteína é empírica, ou seja, baseada em tentativa-erro, e deve ser desenhada para cada proteína individualmente. Não há como prever quais métodos serão os mais eficientes para se purificar uma proteína pela primeira vez.

Sabendo da importância biológica e a grande aplicabilidade destas proteínas o objetivo deste trabalho foi desenvolver metodologias que permitam caracterizar e isolar as proteases presentes no látex de *T. catharinensis*.

Materiais e métodos

Coleta do Látex e Precipitação com acetona

O látex foi coletado através de incisões superficiais do caule de *T. catharinensis* e recolhido em tubo *Falcon* com 25 mL de água destilada. A mistura de látex e água foi centrifugada (5000 x g) a 5°C durante 25 min.

Ao sobrenadante adicionou-se acetona 1:3 (v/v) para a precipitação das proteínas. Após 24 horas, o precipitado obtido foi liofilizado, estocado a -20°C, posteriormente reconstituído no momento das análises químicas e na purificação por cromatografia de troca iônica.

Purificação por cromatografia por troca iônica – catiônica

O precipitado acetônico liofilizado foi colocado em uma coluna empacotada com uma resina de troca iônica *SP-Sepharose* de fluxo rápido que foi pré-equilibrada com tampão acetato 0,01 M, pH 5,0. A coluna foi exaustivamente lavada com o mesmo tampão e as proteínas eluídas com um gradiente de sal linear de 0,15-0,5 M NaCl. Cada fração com 6 mL foi recolhida. O teor de proteínas relativas foi avaliado pela medida de absorbância a 540 nm após a reação como reagente de Biureto, bem como a atividade proteolítica de cada fração foi avaliada.

Doseamento de proteínas

O doseamento de proteínas foi realizado em microescala seguindo a metodologia de Hartree (1972), que é uma modificação do método tradicional descrito inicialmente por Lowry. As análises foram realizadas em

triplicata e a leitura a um comprimento de onda de 620 nm em leitor de ELISA.

Resultados e Discussão

Doseamento de proteínas no precipitado acetônico

A concentração de proteínas foi estabelecida através da curva de analítica utilizando como padrão a Albumina Bovina (Sigma-Aldrich®) em diferentes concentrações. Assim a concentração de proteínas, em porcentagem, foi calculada de acordo com a seguinte fórmula, onde Abs_{620} é a absorbância encontrada em 620 nm:

$$\text{Proteínas (\%)} = 12364,25 \times (Abs_{620}) - 121,51.$$

A concentração de proteínas encontradas no precipitado acetônico foi de 38,21%.

Purificação por cromatografia por troca iônica – catiônica

Com o propósito de identificação e separação de proteínas, 0,263g do precipitado acetônico (correspondente a 100 mg de proteínas totais) foi submetido à purificação por cromatografia por troca iônica. Como resultado da separação obteve-se sessenta e cinco tubos. A absorbância em 540 nm de cada tubo foi determinada a partir da reação com reativo de Biureto. Assim baseando-se nos resultados, obteve-se um gráfico apresentado na Figura 1.

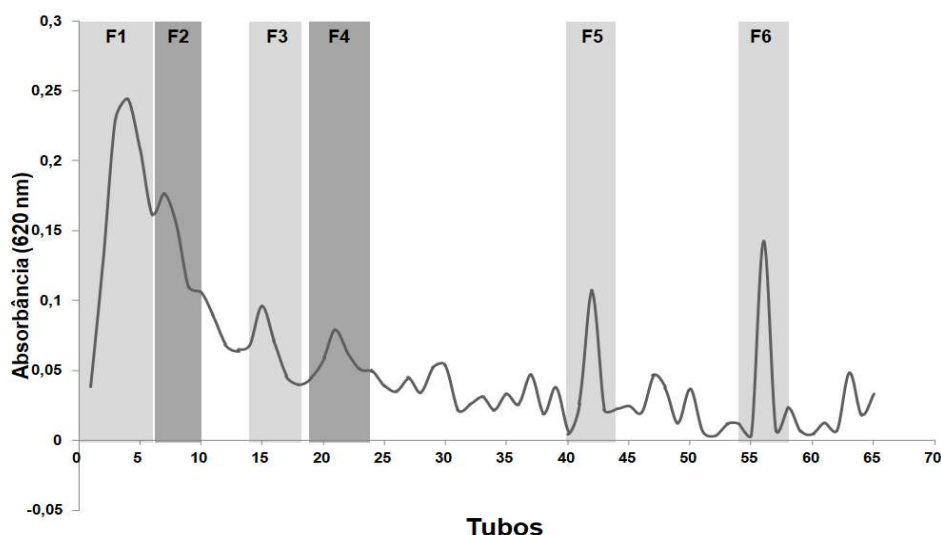


Figura 1- Cromatograma obtido após a purificação das proteínas por troca-iônica. As frações obtidas representam fração 1 (F1) os tubos de 1 a 6, tubos de 7 a 10 (F2), tubos de 14-18 (F3), tubos de 19 a 24 (F4), tubos de 40 a 44 (F5) e tubos de 54 a 58 (F6).

De acordo com os resultados obtidos, pode-se observar que nos tubos de 1 a 6 (Fração 1) se obtiveram maiores concentrações de proteínas. Assim, as soluções contidas nestes tubos foram reunidas e liofilizadas, de forma que obteve-se 0,0625g de material liofilizado, o que corresponde à 24% do precipitado acetônico total. A concentração de proteínas encontrado para a amostra obtida na fração 1 foi de 99%. Este valor elevado esta associado à eficiência do processo de purificação por cromatografia de troca-iônica. A atividade proteolítica desta fração será realizada posteriormente. O doseamento de proteínas e a determinação das atividades proteolíticas das frações seguintes, ainda não foram realizadas até o presente momento.

Conclusões

Em vista das análises apresentadas, conclui-se que a cromatografia por troca iônica – catiônica foi uma técnica eficaz para a separação de proteínas do látex, visto que a fração F1 obtida apresentou uma maior concentração de proteínas do que o precipitado acetônico total, mas o ensaio relacionando este teor à atividade proteolítica precisa ainda ser realizado.

Agradecimentos

Agradecimentos ao CNPq pelo auxílio financeiro para a realização deste trabalho.

Referências

AMID, M; SHUHAIMI, M; SARKER, I. Z.; MANAP, M. Y. A. Purification of serine protease from mango (*Mangifera Indica* Cv. Chokanan) peel using an alcohol/salt aqueous two phase system. **Food Chemistry**, v. 132, p. 1382–1386, 2012.

CORREA, M. PIO; Dicionário das Plantas Úteis do Brasil e das Exóticas Cultivadas, Ministério da Agricultura: Brasília, v.1, p. 632, 1984.

DALLING, J.M. **Plant proteolytic enzymes**. Boca Raton: CRC Press. p.157, 1986.

MUTHU, S.; GOPAL, V. B.; SOUNDARARAJAN, S.; NATTARAYAN, K.; NARAYAN, K. S.; LAKSHMIKANTHAN, M.; PERUMAL, P. Antibacterial serine protease from *Wrightia tinctoria*: Purification and characterization. **Plant Physiology and Biochemistry**, 2017.