



IMOBILIZAÇÃO DE PROTEASES OBTIDAS DO LÁTEX DE *TABERNAEMONTANA CATHARINENSIS* EM GRÂNULOS DE ALGINATO DE CÁLCIO.

Camila Ferreira Amaral (PIBIC/CNPq/FA/UEM), Juliana Cristina Castro¹, Regina Aparecida Correia Gonçalves¹ (co - orientador), Arildo José Braz de Oliveira¹ (Orientador), e-mail: ajb oliveira@uem.br.

¹Departamento de Farmácia, Universidade Estadual de Maringá (UEM) / Centro de Ciências Biológicas e da Saúde/
Maringá, PR.

Farmácia/Farmacognosia

Palavras-chave: Látex, enzimas, imobilização

Resumo:

O látex de *T. catharinensis* possui uma ampla variedade de proteínas, sendo rico especialmente em enzimas proteolíticas. As proteases constituem um dos mais importantes grupos de enzimas tanto a nível industrial quanto acadêmico, tendo uso promissor comercialmente devido às suas múltiplas utilizações na indústria alimentar, farmacêutica, de detergentes, couro, lã e do ponto de vista biotecnológico. Portanto, se faz necessário aumentar a estabilidade das enzimas em condições extremas de pH, temperatura e solventes orgânicos. O aumento da estabilidade contribui para a recuperação e reutilização das enzimas, no caso das proteases, a remoção ou redução de autodigestão (autólise). O seguinte estudo teve por objetivo estudar os efeitos da imobilização do extrato de proteases, este obtido do látex da *T. catharinensis* em alginato de cálcio. A imobilização foi feita segundo QUIROGA et al. (2011), em seguida realizou-se a atividade proteolítica e dosagem de proteínas. Também como forma de purificação das enzimas foi realizada a cromatografia por troca iônica – catiônica. Sendo possível concluir, que o método de imobilização por gotejamento é um método simples, produtivo e rápido. Pode-se dizer que as enzimas do látex bruto possuem uma excelente atividade e concentração de enzimas, sendo esta de 93,4%.

Introdução

A tecnologia enzimática começou a surgir como área de investigação no início da década de 1960, com a imobilização de enzimas para utilização em processos químicos. Uma das principais estratégias para aumentar a estabilidade e reutilização da enzima é a imobilização. A imobilização consiste no aprisionamento da enzima em um suporte sólido para posterior reutilização do biocatalisador, deixando o processo menos trabalhoso, fornecendo uma série de vantagens (MENDES et al., 2011). As vantagens são: utilização da atividade catalítica por um maior período de tempo; possibilidade de aplicabilidade em processos contínuos, com maior facilidade

de controle; algumas vezes, ocorre modificação favorável das propriedades catalíticas da enzima como, maior estabilidade ao pH e à temperatura, entre outros; facilidade de interrupção da reação, em um nível desejado, pela remoção da enzima (MENDES et al., 2011).

Dentre os diferentes biopolímeros que podem ser empregados em tais processos, alginato é um dos mais frequentemente utilizados devido a que a imobilização é realizada sob condições brandas (pH e temperatura fisiológico) sendo assim, não causando alterações prejudiciais a enzima (ZHANG et al., 2009).

Sabendo da importância biológica e a grande aplicabilidade das enzimas e de sua imobilização, o seguinte projeto teve como por objetivo avaliar os efeitos da imobilização do extrato de proteases, obtido do látex da *T. catharinensis* em alginato de cálcio.

Materiais e métodos

Coleta do Látex e Precipitação com etanol P.A

O látex foi coletado por meio 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 × g) a 5°C durante 25 min.

Ao sobrenadante adicionou-se etanol P.A 1:3 (v/v) para a precipitação das proteínas. Após 24 horas, o precipitado obtido foi liofilizado, estocado a -20º C.

Purificação por cromatografia por troca iônica – catiônica

O precipitado etanólico liofilizado foi adicionado 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 alíquotas de 6 mL foram recolhidas. O teor de proteínas relativo foi avaliado pela medida de absorbância a 540 nm após a reação como reagente de Biureto, a atividade proteolítica de cada fração também foi avaliada.

O doseamento de proteínas foi realizado em microescala seguindo a metodologia de Hartree (1972).

Ultradiafiltração

A ultradiafiltração das proteínas foi realizada para as amostras dos tubos de 1 a 10 obtidas da cromatografia por troca iônica, empregando-se um sistema de Ultradiafiltração da Millipore – Amicon com capacidade de 180 mL, utilizando membrana com limite de exclusão de 1 kDa (Millipore).

Determinação da atividade enzimática proteolítica pelo método de azocaseína

A atividade enzimática proteolítica, segundo Charney & Tomarelli (1949), foi realizada em triplicata, utilizando o precipitado em etanol do látex liofilizado, tripsina, e um branco para leitura no espectrofotômetro em 440 nm.

Imobilização

As enzimas presentes no precipitado etanólico, foram imobilizadas em esferas de alginato de cálcio, segundo a metodologia de QUIROGA et al. (2011). Logo, as esferas foram coletadas, lavadas com água destilada e armazenadas a 4 °C.

Resultados e Discussão

Logo após a coleta, foi realizada a precipitação em etanol por um tempo de 24h. Em seguida, o precipitado foi centrifugado e levado ao congelamento, a seguir foi feita a liofilização do mesmo. Obtendo-se 0,200 g de precipitado liofilizado. A partir deste, foram realizadas as análises seguintes.

A concentração de proteínas foi estabelecida empregando-se uma curva analítica, obtido como padrão a Albumina Bovina (Sigma-Aldrich®) em diferentes concentrações. Assim a concentração de proteínas, em porcentagem, foi calculada de acordo com a seguinte formula, onde A_{620} é a absorbância encontrada em 620 nm:

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

A concentração de proteínas encontradas no precipitado em etanol foi de 93,4%.

Após a realização da dosagem de proteínas do material liofilizado, foi realizada a determinação da atividade enzimática do mesmo, a análise foi feita em triplicata, fornecendo um valor médio das amostras de 3,772 U e para a Tripsina de 2,329 U. Isto mostrou que, as amostras apresentaram uma excelente atividade proteoítica mesmo quando comparada com o controle positivo Tripsina.

Com o propósito de identificação e separação das proteínas, 0,107g do precipitado (correspondente a 100 mg de proteínas totais) foram submetidos 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 o seguinte cromatograma apresentado na Figura 1.

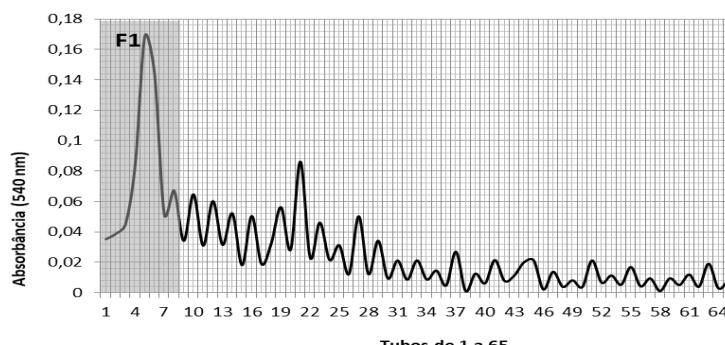


Figura 1 - Cromatograma obtido após a purificação das proteínas por troca-iônica.

Pode-se observar que nos tubos de 1 a 8 (Fração 1) se obtiveram maiores concentrações de proteínas. Assim, as soluções contidas nestes tubos foram reunidas e levadas para dessalinização por ultradiafiltração.



As amostras dos tubos de 1 a 8, (Fração 1, Figura 1), foram reunidas e posteriormente ultradiafiltrados em membrana 1 kDa, com intuito de eliminar o NaCl. Posteriormente, o retido na membrana 1 kDa foi levado para liofilização, obtendo-se 80 mg de amostra liofilizada. Em seguida, o material liofilizado foi submetido a análise de proteínas e a concentração encontrada para a F1, foi de 99%. Este valor elevado esta associado à eficiência do processo de purificação por cromatografia de troca-iônica juntamente com a ultradiafiltração.

Posteriormente foi realizada a análise de atividade proteolítica segundo Charney & Tomarelli (1947), no qual se encontrou 1, 856 U para Tripsina e 6,697 U para a amostra. Apresentando uma atividade proteolítica superior do que na amostra quando ainda não feito o processo de purificação.

A imobilização foi realizada com a amostra bruta de látex, porque o rendimento obtido da purificação não forneceu quantidade de proteínas suficiente para realizar este processo. Na imobilização formaram-se grânulos de alginato de cálcio. Estes grânulos serão analisados segundo a atividade proteolítica da enzima e sua concentração, esta feita segundo o doseamento de proteínas. Dados que posteriormente serão comparadas com a análise do látex bruto.

Conclusões

O método de imobilização por gotejamento é um método simples, produtível e rápido. Pode-se dizer que as enzimas do látex bruto possuem uma excelente atividade e concentração de enzimas, sendo também, de grande utilidade no processo de imobilização. As comparações entre as enzimas imobilizadas e livres ainda serão realizadas.

Agradecimentos

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

Referências

HARTREE E. F. **A Modification of the Lowry method that gives a Linear Photometric responder.** Analytical Biochemistry, vol 48, pág. 422-427, 1972.

MENDES, A. A.; et al. **Aplicação de quitosana como suporte para a imobilização de enzimas de interesse industrial.** Química Nova, v. 34, n. 5, p. 831-840, 2011.

QUIROGA, Evelina et al. **Performance improvement of araujain, a cystein phytoprotease, by immobilization within calcium alginate beads.** Process Biochemistry, v. 46, n. 4, p. 1029-1034, 2011.

TOMARELLI, R.M.; et al. The use of azoalbumin as a substrate in the colorimetric determination of peptic and trypic activity. **Journal of Laboratory and Clinical Medicine**, v.34, p.428-433, 1949.

ZHANG, Y-W.; et al. **Immobilization of Bacillus licheniformis L-arabinose isomerase for semi-continuous L-ribulose production.** Bioscience, biotechnology, and biochemistry, v. 73, n. 10, p. 2234-2239, 2009.