

ANÁLISE DO POTENCIAL DE JARACATIÁ PARA PRODUÇÃO DE PROTEASES

LOPES, Lorena de Oliveira ¹ ; **Fernandes**, Kátia Flávia ²

Palavras-chave: jaracatiá, protease, cerrado

1.INTRODUÇÃO (justificativa e objetivos)

O Jaracatiá ou mamoeiro-do-mato (*Jaracatia spinosa*, Aubl, DC) é uma planta nativa do Brasil que pode ocorrer em várias formações florestais distintas. A papaína é uma enzima proteolítica classificada no grupo das hidrolases. A hidrólise de proteínas pela papaína, resulta em mais peptídeos do que aminoácidos, sendo tal especificidade uma vantagem em certos processos industriais. Essa enzima também pode catalisar a hidrólise de ésteres, amidas e tioésteres. É bastante resistente a temperaturas elevadas e pouco específica, podendo atuar sobre diversos substratos. A papaína encontra, na prática, um grande número de aplicações. Sua maior utilização tem sido na indústria de cerveja,mas pode ser aproveitada, também, no amaciamento de carnes, na indústria farmacêutica, couros, a indústria têxtil, a indústria de alimentos, o tratamento de resíduos, aplicação em rações para nutrição animal e uso em pesquisas. Rotas para a obtenção de preparações enriquecidas de papaína, bem como o procedimento de purificação desta enzima já são bem conhecidos. Adaptações deste procedimento poderiam ser utilizadas para purificação de outras enzimas cisteínicas.

2.METODOLOGIA

2.1- Amostragem

Os testes foram feitos com amostras de plantas coletadas no período de fevereiro e março de 2003, que permaneceram congeladas a -20°C até sua utilização.

2.2 - Obtenção do Extrato Bruto

Para obtenção do extrato bruto, a polpa de jaracatiá foi descongelada, macerada com tampão acetato de sódio 0,1 mol/L pH 3,0, 4,0 e 5,0 e tampão fosfato de sódio 0,1 mol/L pH 6,0 , 7,0 e 8,0 na proporção de 1g amostra/ 1 mL tampão, e submetida a agitação por 10 min. em geladeira a 4°C. A amostra é, então, filtrada e utilizada como extrato bruto.

2.3 - Atividade Proteolítica

A atividade proteolítica foi encontrada através da incubação do extrato bruto com solução de caseína 1% e tampão fosfato 0,1mol/L pH 7,6 a 37°C por 30min. e acréscimo de solução de TCA 5% (ácido tricloroacético).

2.4 -Teste de Atividade na presença de Ativadores e Inibidores

Foram realizados testes para verificar se os compostos EDTA, cistina, PMSF, E-64, Acetato de Mercúrio e PVP teriam efeito sobre a atividade proteolítica de jaracatiá.

2.5 -Teste de Termoestabilidade

O extrato bruto obtido para ensaio foi submetido a banho termostatizado a 100°C por intervalos de tempo variados prosseguindo, posteriormente, com teste de atividade proteolítica.

2.6 - Atividade de Taninos

Testou-se atividade de taninos de importância biológica segundo Hangerman e Butler (1978).

2.7 - Análise protéica

O teor de proteínas foi encontrado segundo teste de Bradford.

2.8 - Precipitação de proteínas com Sulfato de amônio e com acetona

O extrato bruto preparado conforme descrito foi submetido a precipitação com sulfato de amônio nas faixas de saturação de 0-30% e 30-60%. Em outra estratégia, o extrato bruto foi precipitado pela adição de acetona gelada, na proporção de 2 volumes de acetona para cada volume de Extrato Bruto.

2.9 - Cromatografia da fração precipitada com acetona

O material obtido pela precipitação com acetona foi submetido a cromatografia de filtração em gel, em coluna de Sephadex G-75.

2.10 - Teste de afinidade do Extrato Bruto

A F_{ac} foi submetida à cromatografia em coluna de Carboximetil celulose (CM-celulose), um material utilizado em cromatografia de troca-iônica, que apresenta cargas negativas em sua superfície.

2.11 - Teste de Atividade Específica em diferentes pHs

Em extratos preparados em pH de 3,0 a 8,0, foram feitos os testes de atividade proteolítica e de análise protéica, segundo Bradford (1976).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1. Atividade de Taninos

Não foi detectada a presença de taninos.

3.3. Determinação do melhor pH para extração da protease de jaracatiá

Conforme Melo (1997) e Dalling (1986), proteases cisteínicas apresentam larga faixa de pH operacional, podendo atuar entre os pH 3,0 e 8,0. Os resultados obtidos para o jaracatiá mostram uma ampla faixa de pH operacional.

3.4. Atividade Proteolítica

A atividade proteolítica encontrada no extrato da polpa de jaracatiá em pH 3,0 foi alta, comparada a outras plantas já estudadas no nosso laboratório.

3.5. Teste de Atividade na presença de Ativadores e Inibidores

A protease em estudo não apresentou alteração significativa da atividade na presença de EDTA e cistina, o que pode ser um indício de similaridade de comportamento com a papaína de *C. papaya*. PMSF é capaz de inibir proteases cisteínicas e serínicas, E-64 é capaz de inibir proteases cisteínicas, acetato de mercúrio inibe papaína e PVP também inibe proteases serínicas. Todas essas substâncias apresentaram efeito sobre o extrato bruto de jaracatiá.

3.6. Teste de Termoestabilidade

Segundo Melo (1997), a papaína é uma enzima que apresenta boa estabilidade térmica, sendo que esta perde sua atividade quando exposta a 82 °C por 30 min. A enzima apresentou extraordinária estabilidade térmica, com máximo declínio de atividade apenas após exposição a 87°C por 105 min.

3.7. Fracionamento Salino com Sulfato de Amônio

As proteínas precipitaram igualmente nas diferentes faixas de saturação (0-30% e 30-60%). Esse tipo de comportamento é bastante comum em misturas de proteínas contendo mais de uma isoforma de enzima. O fracionamento com acetona, que produz a precipitação da fração protéica total. Neste caso, o rendimento foi bem maior, com uma atividade de 26,1 UE mL⁻¹. Este resultado

aponta também uma sensibilidade da preparação enzimática a altas concentrações de sal ou ao processo de diálise.

3.8.Cromatografia da fração precipitada com acetona

Neste caso, observou-se a presença de três frações, sendo uma de alta, uma de média e uma de baixa massa molecular. Os testes de atividade proteolítica nas frações obtidas nesta cromatografia revelaram uma distribuição de atividade em todas as faixas, reforçando a suposição de existência de múltiplas isoformas da enzima proteolítica.

3.9.Coluna de Troca Iônica

Ao se passar o extrato bruto na coluna de CM-celulose, 57,88% da atividade ficou retida.

3.10.Atividade Especifica em diferentes pHs

O extrato bruto de jaracatiá apresentou alta atividade específica nos diferentes pHs, sendo maior em pH neutro (7,0).

3.11.Cromatografia de Troca Iônica

A seguir, os resultados obtidos na cromatografia em coluna de CM-celulose.

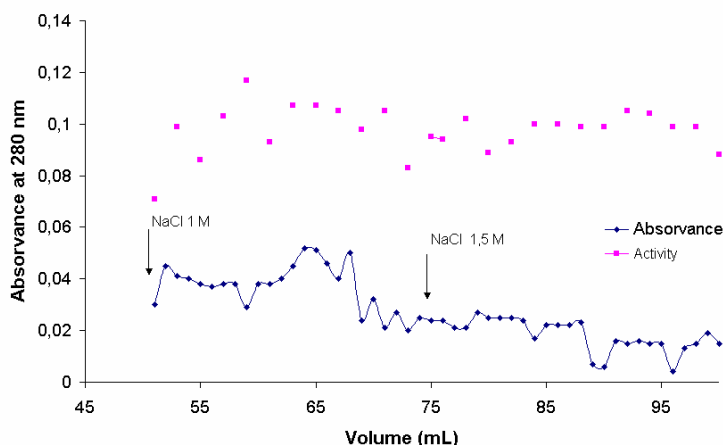


Figura 4 - Cromatografia da fração retida em coluna de CM-celulose

4 – CONCLUSÃO

Os resultados já obtidos indicam que o extrato de jaracatiá possui várias isoformas de enzima. Esta ou estas enzimas, porém, apresentando ampla faixa de pH operacional e alta estabilidade térmica se mostra de grande aplicabilidade industrial para os mais diversos processos.

5-REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

MELO, W. J. Papaína. Uma opção para o produtor de mamão. Funep, ABDR, 1997.

HAGERMAN, A.E. & BUTLER, L.G. Protein precipitation method for the quantitative determination of tannins. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 26, 809-812.

FONTE DE FINANCIAMENTO – CNPq/PIBIC

¹Bolsista de iniciação científica. Instituto de Ciências Biológicas – LQP – Laboratório de Química de Proteínas, loren2508@hotmail.com

²Orientadora/Instituto de Ciências Biológicas/UFG, katia@icb.ufg.br