

# UFAL

**INSTITUTO DE QUÍMICA E BIOTECNOLOGIA**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA E**  
**BIOTECNOLOGIA**

**SERINO PROTEASE E INIBIDOR DE TRIPSINA: PURIFICAÇÃO, CARACTERIZAÇÃO E**  
**APLICAÇÃO BIOTECNOLÓGICA**

CLÁUDIO WILIAN VICTOR DOS SANTOS

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALAGOAS**

Campus A. C. Simões

Tabuleiro dos Martins

57072-970 - Maceió - AL

**CLÁUDIO WILIAN VICTOR DOS SANTOS**

**SERINO PROTEASE E INIBIDOR DE TRIPSINA: PURIFICAÇÃO,  
CARACTERIZAÇÃO E APLICAÇÃO BIOTECNOLÓGICA**

Tese apresentada ao programa de Pós-graduação em Química e Biotecnologia da Universidade Federal de Alagoas, como requisito parcial da obtenção do título de doutor em ciências.

Orientador: Prof<sup>o</sup>. Dr.<sup>o</sup> Hugo Juarez Vieira Pereira

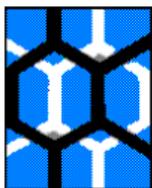
Maceió- AL  
2020

**Catálogo na fonte**  
**Universidade Federal de Alagoas**  
**Biblioteca Central**  
**Divisão de Tratamento Técnico**

Bibliotecário: Marcelino de Carvalho Freitas Neto – CRB-4 – 1767

- S237s Santos, Cláudio Willian dos.  
Serino protease e inibidor de tripsina : purificação, caracterização e aplicação biotecnológica / Cláudio Willian dos Santos. – 2020.  
144 f. : il., graf., tabs. color.
- Orientador: Hugo Juarez Vieira Pereira.  
Tese (doutorado em ciências) – Universidade Federal de Alagoas. Instituto de Química e Biotecnologia. Programa de Pós-Graduação em Química e Biotecnologia. Maceió, 2020.
- Bibliografia: f. 130-144.
1. *C. stipularia*. 2. Inibidores de serino proteinase. 3. Agentes de coagulação - Leite. 4. *C. plumieri*. 5. Inibidores da tripsina. 6. *T. castaneum*. I. Título.

CDU: 66.097.8:663.15



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALAGOAS**  
INSTITUTO DE QUÍMICA E BIOTECNOLOGIA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA E  
BIOTECNOLOGIA



BR 104 Km14, Campus A. C. Simões  
Cidade Universitária, Tabuleiro dos Martins  
57072-970, Maceió-AL, Brasil  
Fone: (82) 3214-1144  
Email: ppgqb.ufal@gmail.com

## FOLHA DE APROVAÇÃO

Membros da Comissão Julgadora da **SERINO PROTEASE E INIBIDOR DE TRIPSINA: PURIFICAÇÃO, CARACTERIZAÇÃO E APLICAÇÃO BIOTECNOLÓGICA**, apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química e Biotecnologia da Universidade Federal de Alagoas no dia 1º de maio de 2020, às 9h, por meio de videoconferência realizada através da ferramenta *Microsoft Teams*.

### Comissão Examinadora:

Prof. Dr. Hugo Juarez Vieira Pereira  
(Presidente da banca - Orientador – PPGQB/IQB/UFAL)

Prof. Dr. Francis Soares Gomes  
(PPGQB/IQB/UFAL)

Prof. Dr. Luciano Aparecido M. Grillo  
Coordenador PPGCF / UFAL  
SIAPE 1663550

Prof. Dr. Luciano Aparecido Meireles Grillo  
(ICF/UFAL)

Profa. Dra. Melissa Fontes Landell  
(ICBS/UFAL)

## **AGRADECIMENTOS**

A Deus, pela oportunidade concedida de ingressar no programa de pós-graduação, por ter sido um pai supridor nos momentos mais delicados que tive que enfrentar ao longo dessa jornada e, por sua companhia incontestável, pois sem Ele, nada do que foi feito poderia ser concluído.

A minha mãe, Maria Luiza Victor, por toda coragem e companheirismo, onde soube com prudência guiar seus filhos em corretos caminhos. Por ter entendido por diversas vezes a minha ausência, e ter acreditado até o fim que conseguiríamos alcançar essa vitória. A meu irmão, Luiz Felipe Victor, por seu esforço e empenho a me ajudar com esse trabalho. A minha vó Epifania e demais familiares, por todo o carinho, dedicação e encorajamento dado.

À minha namorada Andréa Batista, pela atenção, cuidado e paciência ofertada durante os quatro anos que estivemos juntos. Sempre serei grato pela ajuda oferecida, a qual foi determinante ao longo dessa trajetória.

Ao Professor Orientador Drº Hugo J. V. Pereira, pelo acolhimento em seu grupo de pesquisa, atenção e esclarecimentos de dúvidas no campo de pesquisa. Aos demais professores do laboratório, especialmente à professora Drº Edma Miranda, onde estive nos acolhendo com seu cuidado fraternal, e pelos ensinamentos de vida adquiridos ao longo de sua vida acadêmica.

A colega de trabalho e amiga Maria Elizabeth da Costa Marques, por ter sido a profissional responsável em mostrar todos os encantos da Bioquímica. Além da amizade, companheirismo e ensino oferecidos durante os momentos que passamos no laboratório. Por mesmo distantes (na reta final do doutorado), sempre que possível, exercia papel fundamental, no tocante a orientação e aconselhamento.

Aos meus companheiros de pelotão do Curso de Formação e Aperfeiçoamento de Praças da polícia Militar de Alagoas, pela irmandade firmada, pelos maravilhosos momentos passados durante todo o curso de formação; pelo suporte material, emocional e aprendizado trocado até o presente momento.

A todos os colegas do Batalhão de Polícia Rodoviária, pelo grande profissionalismo, coragem e dedicação; por terem mostrado a valorização do companheirismo; pelo incentivo dado em continuar esta pesquisa, e pela flexibilização permitida, que foram fundamentais à continuidade deste trabalho.

A amiga de trabalho Andrea Carla, por seu imenso coração, capaz de aceitar as diferenças, enxergar o próximo pelo que ele é (em sua essência), pelo seu cuidado incomparável, por todas as mensagens de fortalecimento, por ter estado presente nos mais difíceis momentos enfrentados e, por ter sido a pessoa determinante em me fazer continuar esta pesquisa.

Ao professor Dr<sup>o</sup> Luciano Aparecido, por ter confiado e permitido a minha permanência em seu laboratório. Ao amigo e irmão Antônio Thomás, por todos os momentos de companheirismo que vivenciamos. Ao amigo Josiel, pessoa incomparável, atenciosa, e extremamente prestativa.

Aos amigos Cledson Barros, Tatiele, Alexandra, Camila, Dávida, Janaína, Giovanne, João Artur, Fabiana, Marta, Meiriele, Mariana, Josenilda, Erika, Luana, Niete; todos que sofreram, riram, choraram e estiveram presentes com ajuda inestimada em toda pesquisa.

À Universidade Federal de Alagoas-UFAL, ao Instituto de Química e Biotecnologia-IQB, ao Programa de Pós-graduação em Química e Biotecnologia-PPGQB, assim como os órgãos de fomento: Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior-CAPES, e o Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico-CNPQ.

## RESUMO

Sabe-se que a maior parte da comercialização envolvendo a produção de enzimas está centrada na venda de proteases e, o sucesso no uso destas moléculas se deve a fatores como elevada atividade catalítica, seletividade a substratos específicos, assim como a diversidade de produção. Da mesma forma que as reações enzimáticas são úteis em aplicações biotecnológicas, a sua inibição; por outro lado, também tem sido alvo de muitas pesquisas e desenvolvimento científico. Os inibidores de protease (PIs) são tidos como moléculas presentes em praticamente todos os organismos vivos, e desempenham um papel significativo em muitos processos biológicos, através da regulação das funções proteolíticas de enzimas alvo. Diante da necessidade em disseminar estudos voltados à obtenção de proteínas com viés comercial, objetivamos com este trabalho a obtenção de serino proteases e inibidores de tripsina de interesse biotecnológico, seguido de sua purificação, caracterização e aplicação. A realização do trabalho seguiu metodologias comparativas com diferentes estratégias de precipitação (salina, solventes orgânicos e sistema trifásico), assistidas por cromatografia líquida (S-100 Sephacryl e DEAE-Sepharose). Todo o desenvolvimento experimental foi realizado a 4°C, com o intuito de minimizar as perturbações estruturais das proteínas. Em se tratando da aplicação biotecnológica do extrato bruto da espécie *C. stipularia* e do inibidor isolado da espécie *C. plumieri*, foi avaliado, respectivamente, a atividade coagulante (com leite desnatado e integral) e ensaio inibitório (*in vitro*) contra serino protease isolada do intestino do inseto praga *T. castaneum*. Por meio desta pesquisa, foi possível descrever a obtenção de novo coagulante de leite e, purificação de uma tripsina-símilis a partir das sementes da espécie *C. stipularia*; com 45 kDa e atividades ótimas determinadas em 50°C e pH 8,0. Quando submetida a reação com diferentes substratos conjugados com *p*-nitroanilina, a hidrolase mostrou especificidade apenas para o BApNA. Em se tratando dos estudos realizados com a espécie *C. plumieri*, foi possível isolar o inibidor de tripsina com massa estimada em 50kDa; que apresentou alta especificidade inibitória para a protease isolada do *T. castaneum*, o que mostra uma provável utilidade desta molécula no combate ao inseto praga usado na pesquisa.

**Palavras-chave:** *C. stipularia*, serino protease, coagulante de leite, *C. plumieri*, inibidor de tripsina, *T. castaneum*.

## ABSTRACT

It is known that most commercialization involving the production of enzymes is centered on the sale of proteases and the success in the use of these molecules is due to factors such as high catalytic activity, selectivity to specific substrates, as well as the diversity of Production. In the same way that enzymatic reactions are useful in biotechnological applications, their inhibition; on the other hand, it has also been the subject of much scientific research and development. Protease inhibitors (PIs) are seen as molecules present in virtually all living organisms and play a significant role in many biological processes, through the regulation of the proteolytic functions of target enzymes. In view of the need to disseminate studies aimed at obtaining proteins with a commercial bias, with this work we seek to verify serine proteases and trypsin inhibitors of biotechnological interest, followed by their purification, characterization and application. The work was carried out following comparative methodologies with different precipitation strategies (saline solution, organic solvents and three-phase system), assisted by liquid chromatography (S-100 Sephacryl and DEAE-Sepharose). All experimental development was carried out at 4°C, in order to minimize structural protein disorders. As for the biotechnological application of the crude extract of the species *C. stipularia* and the isolated inhibitor of the species *C. plumieri*, the coagulant activity (with skimmed and whole milk) and the inhibitory test (*in vitro*) against the serine protease isolated from the intestine of the pest of insects *T. castaneum*. Through this work, it was possible to describe the obtaining of a new milk coagulant and the purification of the trypsin type from seeds of the species *C. stipularia*; with 45 kDa and optimal activities determined at 50°C and pH 8.0. When subjected to reaction with different substrates conjugated to p-nitroaniline, the hydrolase showed specificity only for BApNA. In the case of studies carried out with the species *C. plumieri*, it was possible to isolate the trypsin inhibitor with an estimated mass of 50kDa; which showed high inhibitory specificity for the isolated protease of *T. castaneum*, which shows a probable usefulness of this molecule in combating the insect pest used in the research.

**Keywords:** *C. stipularia*, serine protease, milk coagulant, *C. plumieri*, trypsin inhibitor, *T. castaneum*.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Ranking Mundial da Indústrias Química.....	25
Figura 2: Variações da implementação biotecnológica.....	27
Figura 3: Mecanismo de ativação de proteases.....	33
Figura 4: Mecanismo de hidrólise das proteases.....	34
Figura 5: Importações e exportações de enzimas no Brasil (MDIC, 2012).....	39
Figura 6: Mecanismo de clivagem enzimática.....	41
Figura 7: Subdivisão das serino proteases digestivas.....	42
Figura 8: Mecanismo de hidrólise de serino proteases.....	43
Figura 9 Mecanismo de catálise covalente e não covalente.....	44
Figura 10: Estrutura tridimensional da $\beta$ -tripsina pancreática bovina.....	45
Figura 11: Distribuição da <i>C. stipularia</i> no território brasileiro.....	53
Figura 12: <i>T. castaneum</i> : (A) fase larva; (B) fase pupa e (C) inseto adulto .....	55
Figura 13 Espécies de estudo: <i>C. stipularia</i> (A) e <i>C. plumieri</i> (B).....	60
Figura 14 Cultivo das espécies <i>C. stipularia</i> (A) e <i>C. plumieri</i> (B).....	62
Figura 15: Hidrólise do N-a-benzoyl-L-arginine-p-nitroanilide (BAPNA).....	62
Figura 16: <i>C. stipularia</i> : sementes verdes (A); sementes secas.....	64
Figura 17: Atividade hidrolítica do extrato de <i>C. stipularia</i> , efeito da concentração perante a hidrólise do substrato BAPNA.....	78
Figura 18: Atividade hidrolítica do extrato de <i>C. stipularia</i> , efeito do tempo de incubação perante a hidrólise do substrato BAPNA.....	80
Figura 19: Atividade hidrolítica do extrato de <i>C. stipularia</i> : efeito da temperatura perante a hidrólise do substrato BAPNA.....	81

Figura 20: Atividade hidrolítica do extrato de <i>C. stipularia</i> , efeito da maturação das sementes na atividade proteolítica.....	83
Figura 21: Atividade hidrolítica do extrato de <i>C. stipularia</i> , efeito da sazonalidade perante a hidrólise do substrato <i>p</i> -nitrofenilpalmitato.....	84
Figura 22: Ação coagulante do extrato das sementes verdes de <i>C. stipularia</i> .....	85
Figura 23: Curva de tempo da ação coagulante do extrato das sementes verdes de <i>C. stipularia</i> .....	86
Figura 24: Temperatura ótima da ação coagulante do extrato das sementes verdes de <i>C. stipularia</i> .....	87
Figura 25: Verificação de atividade coagulante por meio de eletroforese em SDS-PAGE.....	88
Figura 26: Dosagem de proteínas residuais.....	89
Figura 27: Ação coagulante do extrato das sementes verdes de <i>C. stipularia</i> .....	90
Figura 28: Influência da diálise na ação coagulante do EB de <i>C. stipularia</i> .....	91
Figura 29 Precipitação salina com sulfato de amônio para o extrato obtidos a partir das sementes verdes de <i>C. stipularia</i> .....	91
Figura 30: Cromatograma S-100 Sephacryl, pós-Sulfato de amônio ( <i>C. stipularia</i> )	93
Figura 31: Eletroforese: SDS-PAGE (12%) da protease purificada a partir das sementes de <i>C. stipularia</i> .....	94
Figura 32: Precipitação com etanol.....	96
Figura 33: Precipitação com acetona.....	97
Figura 34: Atividade enzimática, hidrólise do substrato BApNA.....	99
Figura 35 Perfil de precipitação em sistema de partição trifásico (TPP).....	99
Figura 36: Frações pós- sistema trifásico (TPP).....	100
Figura 37: Atividade enzimática das frações do sistema de partição trifásico (TPP).....	101

Figura 38: análise do nível de recuperação das precipitações da serino protease extraída das sementes de <i>C. stipularia</i> .....	102
Figura 39: SDS-PAGE. Análise comparativa dos solventes orgânicos na precipitação de proteínas.....	103
Figura 40: Cromatograma S-100 Sephacril, pós-TPP.....	104
Figura 41: pH ótimo da protease isolada das sementes de <i>C. stipularia</i> : Curva de pH ótimo.....	105
Figura 42: temperatura ótima da protease isolada das sementes de <i>C. stipularia</i> : Curva de temperatura ótima.....	106
Figura 43: estabilidade em pH da protease isolada a partir das sementes de <i>C. stipularia</i> .....	108
Figura 44: estabilidade térmica da protease isolada a partir das sementes de <i>C. stipularia</i> .....	108
Figura 45: especificidade da protease isolada de <i>C. stipularia</i> .....	110
Figura 46: Gráfico de Michaelis–Menten para a protease isolada de <i>C. stipularia</i> .....	111
Figura 47: Atividade inibitória do extrato bruto de <i>C. plumieri</i> , efeito da concentração.....	112
Figura 48: Atividade inibitória do extrato bruto de <i>C. plumieri</i> , efeito da temperatura.....	116
Figura 49: Zimografia reversa do extrato de <i>C. plumieri</i> .....	117
Figura 50: ensaio inibitório em fase sólida com o extrato de <i>C. plumier</i> .....	118
Figura 51: precipitação salina com sulfato de amônio do EB da espécie <i>C. plumieri</i> .....	120
Figura 52: precipitação de proteínas com etanol a partir do EB da espécie <i>C. plumieri</i> .....	121
Figura 53: Cromatograma DEAE-Sepharose.....	122

Figura 54: Atividade inibitória do extrato bruto de <i>C. plumieri</i> pós-diálise.....	122
Figura 55: Eletroforese: SDS-PAGE (12%) do inibidor de tripsina purificada a partir das sementes de <i>C. plumieri</i> .....	123
Figura 56: especificidade do inibidor de tripsina purificado a partir das sementes de <i>C. plumieri</i> .....	124
Figura 57: teste de inibição <i>in vitro</i> com a protease isolada do intestino do inseto praga <i>T. castaneum</i> .....	126
Figura 58: análise densitométrica da degradação da caseína polimerizada em gel de poliacrilamida.....	126
Figura 59: teste de inibição <i>in vitro</i> com a protease isolada do intestino do inseto <i>T. castaneum</i> .....	127
Figura 60: Cálculo de IC50 para a inibição de tripsina comercial com a proteína isolada das sementes de <i>C. plumieri</i> .....	128

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Classificação internacional das enzimas: Nomenclatura da União Internacional de Bioquímica e Biologia Molécula.....	26
Tabela 2: Classificação botânica da espécie <i>C. stipularia</i> .....	52
Tabela 3: Hidrólise de BApNA em função da concentração do EB de <i>C. stipularia</i> .	63
Tabela 4: Hidrólise de BApNA em função da concentração do extrato bruto.....	66
Tabela 5: precipitação Salina: relação em massa da proporção de sulfato de amônio aplicado no experimento.....	69
Tabela 6: Resumo da purificação da serinoprotease a partir das sementes verdes de <i>C. stipularia</i> .....	104

## LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

Ala	Alanina
Arg	Arginina
BApNA	Hidrólise do N-a-benzoyl-L-arginine-p-nitroanilide
DMSO	Dimetilsulfóxido
EDTA	Ácido Etilenodiaminotetracético
g	Grama
Gly	Glicina
h	Horas
HCl	Ácido Clorídrico
Kcat	Número de <i>turnover</i>
K	Lisina
Kg	Quilograma
<i>K<sub>m</sub></i>	Constante de Michaelis–Menten
Lys	Lisina
ml	Mililitros
min	Minutos
MPA	Ministério da Pesca e Aquicultura
NaCl	Cloreto de sódio
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	Sulfato de Amônio
PB	Peptídeos bioativos
pH	Potencial hidrogeniônico
Phe	Fenilalanina
PIB	Produto Interno Bruto
PMSF	Fluoreto de Fenilmetilsulfonil
R	Arginina
RNA	Ácido Ribonucleico
SDS	Dodecil Sulfato de Sódio
SDS-PAGE	Eletroforese em gel de poliacrilamida com dodecil sulfato de sódio
Sebrae	Serviço de Apoio às Micro e pequenas Empresas
T	Temperatura (°C)
t	Tempo (min)

TE	Tampão de Extração
TEMED	Tetrametiletenodiana
TRIS	Tris-(hidroximetil)-aminometano
U/mL	Unidade de atividade por Mililitro
Vmax	Velocidade máxima da reação

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	211
<b>2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b> .....	242
<b>2.1 Implementação da Indústria Química</b> .....	24
<b>2.2 Avaliação do uso de Enzimas na Produção Industrial</b> .....	25
2.2.1 Indústria de couros .....	28
2.2.2 Indústria têxtil .....	28
2.2.3 Indústria de detergentes.....	29
2.2.4 Indústria de alimentos e bebidas.....	30
<b>2.3 Proteases</b> .....	31
2.3.1 Aplicações biotecnológicas .....	34
2.3.2 Proteases na indústria de detergentes.....	36
2.3.3 Proteases na indústria alimentícia.....	38
2.3.4 Proteases em fontes vegetais .....	40
2.3.5 Tripsina.....	42
<b>2.4 Inibidores de Proteases</b> .....	48
2.4.1 Classificação dos Inibidores de Proteases de Origem Proteica .....	48
2.4.2 Inibidores de Proteases como Fatores de Proteção de Plantas.....	50
<b>2.5 Modelos Biológicos</b> .....	51
2.5.1 <i>Crotalaria stipularia</i> (DESV., 1814) (FARBALES: FABACEAE) .....	51
2.5.2 <i>Centrosema plumieri</i> (BENTH) (FARBALES: FABACEAE).....	53
2.5.3 Utilização de proteínas no combate ao inseto praga <i>Tribolium castaneum</i> ..	54
<b>2.6 Estratégias de Precipitação de Proteínas</b> .....	55
2.6.1 Precipitação salina .....	56
2.6.2 Precipitação com solventes orgânicos (acetona e etanol).....	57
2.6.3 Precipitação de proteína por sistema trifásico (TPP) .....	58
<b>3. OBJETIVOS</b> .....	59

<b>3.1 Objetivo Geral</b> .....	59
<b>3.2 Objetivos Específicos</b> .....	59
3.2.1 <i>C. stipularia</i> .....	59
3.2.2 <i>C. plumieri</i> . .....	59
<b>4. METODOLOGIA</b> .....	60
<b>4.1 Identificação das Espécies <i>C. stipularia</i>, <i>C. plumieri</i> e Preparo do Extrato Bruto</b> .....	60
<b>4.2 Cultivo das Espécies <i>C. stipularia</i> e <i>C. plumieri</i></b> .....	61
<b>4.3 Ensaio Enzimático</b> .....	62
4.3.1 Efeito da concentração do extrato bruto de <i>C. stipularia</i> na hidrólise do substrato BApNA (N-a-benzoyl-L-arginine-p-nitroanilide) .....	62
4.3.2 Efeito do período de incubação na atividade proteolítica do EB de <i>C. stipularia</i> .....	63
4.3.3 Efeito da temperatura na atividade proteolítica do EB de <i>C. stipularia</i> .....	63
4.3.4 Efeito da maturação das sementes de <i>C. stipularia</i> na atividade proteolítica .....	63
4.3.5 Ensaio inibitório do EB de <i>C. plumieri</i> frente a tripsina bovina comercial.....	65
4.3.6 Efeito da concentração do EB de <i>C. plumieri</i> na atividade inibitória .....	66
4.3.7 Efeito da temperatura na atividade inibitória do EB de <i>C. plumieri</i> .....	67
4.3.8 Ação inibitória do EB de <i>C. plumieri</i> avaliada por zimografia reversa .....	67
4.3.9 Ensaio inibitório do EB de <i>C. plumieri</i> em fase sólida .....	68
<b>4.4 Estratégias de Purificação de Proteínas</b> .....	68
4.4.1 Precipitação de proteínas com sulfato de amônio (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> .....	68
4.4.2 Precipitação de proteínas com solventes orgânicos (acetona e etanol).....	69
4.4.3 Precipitação de proteínas por sistema trifásico- TPP .....	69
4.4.4 Purificação de proteínas por métodos cromatográficos .....	70
<b>4.5 Eletroforese SDS-PAGE</b> .....	71
<b>4.6 Determinação da Concentração de Proteína (<i>C. stipularia</i> e <i>C. plumieri</i>)</b> 71	

<b>4.7 Determinação de Parâmetros Cinéticos</b> .....	71
4.7.1 Estabilidade e determinação da atividade ótima em diferentes pHs para a protease isolada das sementes verdes de <i>C. stipularia</i> .....	71
4.7.2 Estabilidade e determinação da temperatura ótima da protease isolada das sementes verdes de <i>C. stipularia</i> .....	72
4.7.3 Especificidade da enzima purificada de <i>C. stipularia</i> perante substratos sintéticos conjugados com <i>p</i> -nitroanilina ( <i>p</i> -NA) .....	72
4.7.4 Determinação de constantes cinéticas para a protease isolada de <i>C. stipularia</i> .....	72
4.7.5 Especificidade do inibidor de tripsina isolado das sementes de <i>C. plumieri</i> frente a diferentes enzimas proteolíticas .....	73
4.7.6 Determinação das constantes cinéticas do inibidor isolado de <i>C. plumieri</i> (IC50 e Ki).....	73
<b>4.8 Aplicações Biotecnológicas</b> .....	73
4.8.1 Teste de coagulação do EB de <i>C. stipularia</i> com leite desnatado.....	73
4.8.2 Efeito da temperatura no processo de coagulação do leite.....	74
4.8.3 Verificação da hidrólise de caseína do leite desnatado por eletroforese e dosagem de proteínas solúveis.....	74
4.8.4 Teste de coagulação do EB de <i>C. stipularia</i> com leite integral pasteurizado e influência da diálise na ação coagulante.....	75
4.8.5 Teste de inibição, <i>in vitro</i> , da proteína isolada das sementes de <i>C. plumieri</i> contra tripsina-símilis isolada do intestino do inseto praga <i>T. castaneum</i> .....	75
<b>5. RESULTADOS</b> .....	77
<b>5.1 Obtenção das Sementes de <i>C. stipularia</i> e Preparo do Extrato Bruto</b> .....	78
<b>5.2 Efeito da Maturação das Sementes Sobre a Atividade Proteolítica do Extrato de <i>C. stipularia</i></b> .....	82
<b>5.3 Aplicação Biotecnológica para o EB da Espécie <i>C. stipularia</i></b> .....	84
5.3.1 Teste de coagulação em leite desnatado .....	84
5.3.2 Efeito da temperatura no processo de coagulação do leite.....	86

5.3.3 Verificação da hidrólise de caseína por eletroforese e dosagem de proteínas solúveis residuais .....	88
5.3.4 Teste de coagulação de leite integral pasteurizado e influência da diálise na ação coagulante .....	89
<b>5.4 Precipitação com Sulfato de Amônio .....</b>	<b>91</b>
<b>5.5 Cromatografia Líquida: S-100 Sephacryl .....</b>	<b>92</b>
<b>5.6 Eletroforese em Gel de Poliacrilamida .....</b>	<b>93</b>
<b>5.7 Precipitação com Solventes Orgânicos (Acetona e Etanol).....</b>	<b>95</b>
<b>5.8 Sistema de Precipitação Trifásico- TPP .....</b>	<b>98</b>
<b>5.9 pH Ótimo e Temperatura Ótima .....</b>	<b>105</b>
<b>5.10 Estabilidade em pH e Estabilidade Térmica.....</b>	<b>107</b>
<b>5.11 Especificidade da serino protease isolada de <i>C. stipularia</i> para substratos sintéticos conjugados com p-nitroanilina (p-NA).....</b>	<b>109</b>
<b>5.12 Estudos Cinéticos .....</b>	<b>110</b>
<b>5.13 Efeito da Concentração do Extrato na Atividade Inibitória .....</b>	<b>114</b>
<b>5.14 Efeito da Temperatura na Atividade Inibitória do Extrato de <i>C. plumieri</i> .....</b>	<b>115</b>
<b>5.15 Zimografia Reversa com o Extrato de <i>C. plumieri</i>.....</b>	<b>117</b>
<b>5.16 Ensaio Inibitório em Fase Sólida com o Extrato de <i>C. plumieri</i>.....</b>	<b>118</b>
<b>5.17 Precipitação com Sulfato de Amônio a Partir do Extrato de <i>C. plumieri</i> .....</b>	<b>119</b>
<b>5.18 Precipitação com Solvente Orgânico (etanol) a Partir do Extrato de <i>C. plumieri</i> .....</b>	<b>120</b>
<b>5.19 Cromatografia Líquida com o Extrato Bruto de <i>C. plumieri</i>, e SDS-PAGE .....</b>	<b>121</b>
<b>5.20 Teste de Especificidade Inibitória para Diferentes Enzimas Proteolíticas .....</b>	<b>124</b>
<b>5.21 Aplicação Biotecnológica para o inibidor de Tripsina Isolado das Sementes de <i>C. Plumieri</i>.....</b>	<b>125</b>

5.22 Determinação de Parâmetros Cinéticos (IC50 e Ki) .....	128
6. CONCLUSÃO.....	129
6.1 Serino protease isolada de <i>C. stipularia</i> .....	129
6.2 inibidor de tripsina isolado de <i>C. plumieri</i> .....	129

## 1. INTRODUÇÃO

A elevação da atividade industrial, bem como os impactos na economia global estiveram sempre associados a participação da indústria química e, que via de regra, assumia o papel de assegurar uma melhor qualidade de vida por meio dos produtos distribuídos no mercado. Durante muitos anos esse avanço esteve concentrado na utilização extrativista de recursos naturais, onde o seu uso desenfreado acarretou no agravamento de algumas problemáticas ambientais.

Uma proposta alternativa que vem ganhando maior posicionamento no segmento econômico é biotecnologia, em que através do reaproveitamento da biomassa consegue elaborar mecanismos industriais alternativos, com baixa agressividade ao ecossistema local, e com maior sustentabilidade. Como enfoque desta tendência, destaca-se a participação das enzimas em plantas industriais, as quais agem de forma específica, agindo sob condições de reação mais brandas que os produtos químicos tradicionais. Além disso, eles são prontamente biodegradáveis e; geralmente, levam a redução ou ausência de toxicidade quando atingem o meio ambiente (BILAL et al., 2019). De forma prática, observa-se que a aplicação de enzimas nos processos biotecnológicos oferece algumas vantagens, como maior seletividade e baixas concentrações, em comparação com os métodos sintéticos, sendo por isso, ampliada a sua utilização em diversos segmentos da biocatálise (SHELDON e WOODLEY, 2018; ADAMS, et al., 2019).

Sabe-se que a maior parte da comercialização envolvendo a produção de enzimas está centrada na manipulação de proteases e, o sucesso no uso destas moléculas se deve a fatores como maior degradação, quando comparadas aos catalisadores sintéticos, elevada atividade catalítica, seletividade aos substratos específicos, assim como a diversidade de produção (GURUMALLESH et al., 2019). Por outro lado, sobre os benefícios econômicos, percebe-se que a adequação destas proteínas a insumos processuais favorece em grandes proporções, a economia local, principalmente pelo valor atribuído a molécula comercializada.

Comparado com as proteases de vertebrados, as enzimas produzidas por plantas apresentam menor incidência na utilização em processos industriais, sendo que os seus relatos literários, são datados de milhares de anos. O grande interesse em utilizar processos bioquímicos em escala industrial é que na maior parte dos casos, o custo de produção e, agressão ambiental, tende a ser bem inferior, em

comparação com as metodologias inorgânicas e, de tratamentos mecânicos. Por outro lado, por influência da produção em larga escala, ou mesmo pelo baixo custo de produção, as proteases de origem vegetal tiveram seu espaço industrial decrescido, ao passo que a utilização de enzimas purificadas de micro-organismos cresceu exponencialmente (FEIJOO-SIOTA e VILLA, 2010). Entretanto, mesmo com esse desequilíbrio mercadológico, o número de trabalhos realizados com a finalidade de purificar serino proteases de origem vegetal tem revelado forte importância, principalmente pelo fato de não necessitarem de agentes redutores e quelantes como aditivos, e por se mostrar estável em expressiva faixa de pH e temperatura (LI et al., 2018).

Assim como as reações enzimáticas são utilitárias em aplicações biotecnológicas, a sua inibição, por outro lado, também tem sido alvo de muitas pesquisas e desenvolvimento científico, principalmente como alvos farmacológicos, agindo seletivamente ao sítio ativo da molécula e, com isso, minimizando os efeitos deletérios aos pacientes tratados. Com relação a ação dos inibidores de enzimas podemos dividi-los em reversíveis e irreversíveis. Os inibidores irreversíveis formam uma estável ligação covalente com o sítio ativo da enzima, impossibilitando que esta acelere a processabilidade do substrato. Em contrapartida, aqueles ditos reversíveis (competitivo, misto e não competitivo) interagem com a proteína (enzima) por meio de interações fracas (ligação de hidrogênio, ligação hidrofóbica e iônicas), modificando a estrutura tridimensional da proteína e, com isso, inviabilizando o seu encaixe ao substrato.

Da mesma forma que o comércio internacional de proteases tem alcançado o percentual de praticamente metade do total de enzimas produzidas, a descoberta por moléculas inibitórias tem também mostrado expressivo destaque. Os inibidores de protease (PIs) são tidos como moléculas presentes em praticamente todos os organismos vivos, desempenhando papel significativo em muitos processos biológicos, por regulação das funções proteolíticas de suas enzimas alvo (VAGADIA, VANGA e RAGHAVAN, 2017). Devido à sua capacidade de inibir as proteases, incluindo as do sistema digestivo humano e, reduzir a biodisponibilidade das proteínas, os IPs passaram a ser considerados como antinutrientes (ZHAO et al., 2018). Entretanto, a sua atribuição é ainda mais abrangente, por intermédio de ação preventiva contra uma série de doenças; como câncer, esclerose múltipla,

inflamação e Duchenne, distrofia muscular (CLEMENTE et al., 2011; KOBAYASHI, 2013; HERNÁNDEZ-LEDESMA e HSIEH, 2017).

Assim, diante da necessidade em disseminar estudos voltados a obtenção de proteínas com viés comercial, objetivamos com este trabalho a verificação de serino proteases e inibidores de tripsina de interesse biotecnológico, seguido de sua purificação, caracterização e aplicação.

## 2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 Implementação da Indústria Química

A indústria química abrange a produção de petroquímicos, agroquímicos, produtos farmacêuticos, tintas, polímeros dentre outros e, para ser caracterizado como um produto desta natureza, o mesmo deve passar por processos químicos (reações químicas) que formam novas substâncias com características físico-químicas diferentes das substâncias iniciais (BRITO, 2017).

É importante destacar que em função da condição socioeconômica de cada país, bem como as políticas governamentais neles implementadas, o crescimento desse segmento se deu de maneira heterogênea e, que nos países subdesenvolvidos, a sua disseminação se deu de modo mais retardatário. Não obstante, por se tratar de uma ciência extremamente experimental, demorou certo tempo para dispor de recursos teóricos que permitissem realizar as previsões dos resultados e as condições necessárias para que os fenômenos químicos ocorressem (BRITO, 2017). A partir daí a indústria química teve como iniciar suas atividades e, ao longo da história, os impactos por ela gerado se estenderam por demais países e continentes.

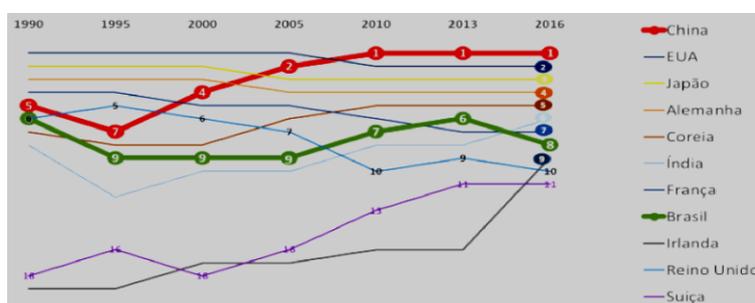
Sob uma análise contemporânea, a indústria química está presente em praticamente todos os bens de consumo e em todas as atividades econômicas, oferecendo soluções e, contribuindo para a melhoria dos processos e qualidade dos produtos. A dependência por capital, conhecimento e, recursos humanos qualificados, faz com que o segmento produza uma grande quantidade de insumos para todos os setores (ABIQUIM, 2010). Além disso, os investimentos da química são de grande porte, intensivos em capital, caracterizados por elevados prazos de maturação e extensa vida útil. Como resultado, os valores desses investimentos são representativos, quando confrontados com os montantes despendidos na maioria dos outros segmentos industriais (ABIQUIM, 2010).

Atualmente no Brasil, os produtos químicos presentes em todos os segmentos da indústria de transformação, no consumo doméstico e, na agricultura, são obtidos principalmente por meio de matérias fósseis. Devido ao fato de nos últimos anos a demanda ter sido atendida por importações, a indústria química

brasileira apresentou grande potencial de desenvolvimento, ocupando a nona posição no ranking de faturamento líquido da indústria química (ABEQ, 2014).

Ainda sobre os relatórios desta associação, no ano de 2017 a produção brasileira alcançou um faturamento líquido de aproximadamente US\$ 119,6 bilhões, o que corresponde a 9,5% a mais ao registrado em 2016, quando a indústria química faturou US\$ 109,2 bilhões (ABQUIM, 2017). Com esse montante, o Brasil se manteve na 8ª posição, status já confirmado no ano anterior (Figura 1), responsabilizando também pela 3ª posição no PIB industrial nacional (ABQUIM, 2017).

Figura 1: Ranking Mundial das Indústrias Químicas



Adaptado de Marchi, 2017

Esse tipo de evolução, é reflexo de inúmeros programas elaborados, como forma de assegurar uma melhor adequação e, estruturação das empresas atuantes na área, sobretudo, na possibilidade de formar a real participação colaborativa de entes participantes, como universidades, centros tecnológicos de pesquisa e muitos outros. De acordo com estudo realizado por Mansur (2005), onde avaliou a indústria de processamento químico no Brasil, sobre a ótica das motivações para pesquisa, desenvolvimento e suas interfaces com as políticas governamentais; a química é uma ciência experimental. Desta feita, para que as indústrias brasileiras se mostrem consolidadas e competitivas, deveriam acima de tudo, deter pessoal qualificado em seus quadros profissionais e, além disso, precisaria estar intimamente conveniada com universidades/Institutos que disponham de pesquisadores que saibam trabalhar em laboratórios e, que tenham vocação para trabalhos experimentais.

## 2.2 Avaliação do uso de Enzimas na Produção Industrial

Conforme visto anteriormente, a elevação da atividade industrial, bem como os impactos na economia global; estiveram sempre associados a participação da indústria química e, que via de regra, assumia o papel de assegurar uma melhor

qualidade de vida por meio dos produtos distribuídos no mercado. Durante muitos anos, esse avanço esteve concentrado na utilização extrativista de recursos naturais, onde o seu uso desenfreado, acarretou no agravamento de algumas problemáticas ambientais.

Por se tratarem de proteínas produzidas em praticamente todos os seres vivos; e por atuarem como catalisadores em diferentes reações bioquímicas, as enzimas são vistas como uma importante ferramenta biotecnológica, capaz de assegurar, em alguns processos industriais, a sustentabilidade não alcançada por intermédio das técnicas mais tradicionais (CHOI, HAN e KIM, 2015). De acordo com Demain e Fang (2000) a utilização de enzimas na produção de bens para consumo humano remonta há pelo menos 2000 anos, quando os micro-organismos foram impostos no processo de sacarificação do arroz e, fermentação de pães. Na verdade, o mecanismo enzimático era desconhecido até 1877, quando Moritz Traube propôs que “materiais semelhantes às proteínas aceleravam a fermentação e outras reações químicas”. Mais tarde, a demonstração histórica de Buchner em 1897, mostrou que a fermentação alcoólica poderia ser realizada usando extrato de levedura sem intervenção celular, ocorrendo então, a primeira aplicação de biocatálise (JEGANNATHAN e NIELSEN, 2013).

Existem atualmente mais de 5.500 enzimas identificadas (BRENDA, 2012), as quais são classificadas com base no tipo de reação que elas catalisam (oxidorreduções, transferases, hidrolases, liases, isomerases e ligases). (Tabela 1).

Tabela 1: Classificação internacional das enzimas: Nomenclatura da União Internacional de Bioquímica e Biologia Molecular

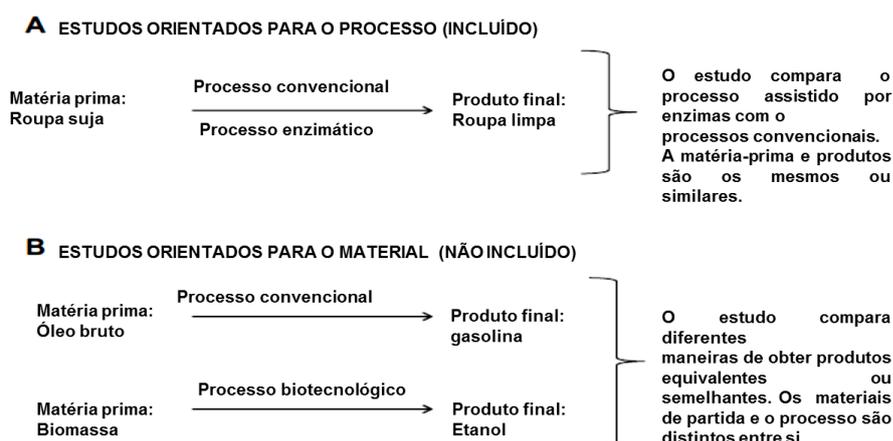
<b>Classe nº</b>	<b>Nome da Classe</b>	<b>Reação Catalisada</b>
1	Oxirredutases (EC 1.x.y.z)	Transferência de Elétrons
2	Transferases (EC 2.x.y.z)	Transferência de Grupos
3	Hidrolases (EC 3.x.y.z)	Reações de Hidrólise
4	Liasas (EC 4.x.y.z)	Adição de grupos e ligações duplas
5	Isomerases (EC 5.x.y.z)	Transferência de grupos de uma mesma molécula
6	Ligases (EC 6.x.y.z)	Formação de Ligações

Fonte: elaborada pelo autor, 2020

Estas proteínas são altamente específicas, agindo sob condições de reação mais brandas que os produtos químicos tradicionais. Além disso, eles são prontamente biodegradáveis e; geralmente, levam a redução ou ausência de toxicidade quando atingem o meio ambiente (BILAL et al., 2019). De forma prática, observa-se que a aplicação de enzimas nos processos biotecnológicos oferece algumas vantagens, como maior seletividade e baixas concentrações, em comparação com os métodos sintéticos, sendo por isso, ampliada a sua utilização em diversos segmentos da biocatálise (SHELDON e WOODLEY, 2018; ADAMS, et al., 2019). No entanto, é importante destacar que em alguns casos a utilização de catalisadores biológicos se mostra ineficiente e, por isso, faz-se necessário lançar mão dos processos mais rudimentares. Um exemplo, seria os custos de produção, bem como a necessidade de que sejam difundidos demais estudos que visem a descoberta de novas moléculas com maior dinamismo reacional (SANDOVAL e HYSTER, 2020).

A abordagem da implementação da atividade biotecnológica pode ser esquematizada sob duas perspectivas: aquela envolvida na completa substituição do processo tradicional, pela ação enzimática (Figura 2-A) e a que convalida a implementação de materiais e processos alternativos (Figura 2-B).

Figura 2: Variações da implementação biotecnológica



Fonte: Adaptado de Jegannathan e Nielsen, 2013

Entretanto, para este trabalho, estaremos levando em consideração apenas primeira possibilidade, em que será verificado as atuais implementações de moléculas enzimáticas em escala industrial. A seguir, serão mostrados alguns exemplos de processos de fabricação, assim como os avanços obtidos por intermédio da utilização de enzimas na linha de produção industrial.

### 2.2.1 Indústria de couros

Muitos acessórios como bolsas, sapatos, estofados de móveis e relógios, são fabricados a partir do couro retirado das peles de animais e, dependendo da espécie escolhida, o tratamento químico da matéria prima se torna indispensável. Embora seja bem difundida a manipulação dos couros, o tratamento dos resíduos industriais são sempre uma problemática para o ecossistema local (KANDASAMY et al., 2012). Em função desta observação, outros mecanismos auxiliares (processos biotecnológicos) passaram a ser implementados, na finalidade de minimizar os gastos, bem como regredir os impactos ecológicos ocasionados no sistema tradicional de produção. Dentre as possibilidades, destaca-se a implementação de enzimas queratinolíticas, que dependendo planta industrial, pode proporcionar uma redução de até 80% insumos emitidos, tais como gases nocivos, e demais resíduos sólidos (PAUL et al., 2016). Os pesquisadores ainda ressaltam algumas limitações do setor alternativo, que seria a melhoria da eficiência enzimática e estabilidade da proteína durante a comercialização.

### 2.2.2 Indústria têxtil

Durante a sua manipulação, o algodão (*in natura*) sofre vários tratamentos, como a lavagem, branqueamento, polimento e, tingimento, antes de ser transformado em fio e tecido. Esses procedimentos, por via de regra; requerem elevado custo energético, e uma alta demanda de água (TOUNSADI et al., 2020), fazendo com que essa atividade industrial seja considerada como uma das principais causadoras de agressão ao ecossistema.

Para minimizar os impactos ecológicos, assim como reduzir as problemáticas discutidas, implementou-se como estratégia auxiliar, aplicação de enzimas no processamento na indústria têxtil (MADHU, CHAKRABORTY, 2017) sobretudo, na otimização do processo assistido pela proteína, em detrimento do mecanismo rudimentar.

Os tecidos de malha e fios para tecidos leves; antes de serem tingidos, são branqueados com a adição de peróxido de hidrogênio, o qual deve mais tarde ser remanejado. Para que o tingimento ocorra de maneira uniforme, tal reagente é tradicionalmente removido pela utilização de água quente, ou por ação de agentes redutores (tiosulfato de sódio), o que acaba exigindo; por parte das fábricas, um

alto recurso hídrico (JEGANNATHAN e NIELSEN, 2013). Por outro lado, por meio da utilização de oxirredutases, a desconstrução do peróxido de hidrogênio pode ser efetivada em condições brandas, em baixas temperaturas e, que a planta industrial pode ser otimizada para um único processo. Além disso, Kadam et al., (2018) reportaram a intrínseca participação da catalase na biotransformação de corantes têxteis, agindo como consequência, na redução do consumo de água em níveis bem mais expressivos, quando comparado com as metodologias não assistidas por catalisadores biológicos.

Semelhante à catalase, a enzima arilesterase pode ser usada no processo de branqueamento de algodão. A enzima catalisa a hidrólise de diacetato de propileno glicol e peróxido de hidrogênio a propilenoglicol e idoperácico. O método atua como um agente clareador sob condições operacionais mais brandas, do que o branqueamento rudimentar, poupando energia e, evitando a perda de algodão. Dettore (2011) em estudo feito com o branqueamento de algodão, mostrou que o impacto ambiental de um processo de branqueamento assistido por enzimas é menos dispendioso, aos efetuados por mecanismos não assistidos.

### 2.2.3 Indústria de detergentes

Os surfactantes são uns dos principais constituintes dos detergentes, removendo as manchas das roupas durante a sua lavagem. Normalmente, a produtividade deste insumo é destinada ao uso em limpeza doméstica, de forma que no ano de 2012, resultou numa movimentação econômica de aproximadamente US\$ 60,9 bilhões (BIANCHETTI et al., 2015). Estas substâncias apresentam maiores eficiências na limpeza quando expostas a altas temperaturas e, para isso; faz-se necessário nas grandes lavanderias, um alto consumo energético (SINGH et al., 2018), principalmente nos países mais frios. Além disso, os surfactantes liberados no meio ambiente após lavagem são tóxicos para as espécies aquáticas, a menos que sejam removidos em estações de tratamento hídrico (CARRASCHI et al., 2012).

Uma alternativa que vem sendo utilizada de forma a minimizar as agressões provocadas pelos surfactantes é através da elaboração dos “detergentes verdes” (SINGH et al., 2018) com a incorporação de enzimas funcionais aos métodos tradicionais. Tais moléculas possuem a capacidade de degradar as manchas das roupas à baixas temperaturas e, apresentam menor toxicidade que os agentes

surfactantes (OECD, 2011). Dos Santos et al., (2020) reportaram em estudo conjunto que a incorporação da tripsina isolada da espécie aquática *Coryphaena hippurus* em detergentes comerciais resultou numa expressiva atividade catalítica da enzima, enfatizando a sua compatibilidade como componente adicional aos detergentes industriais.

#### 2.2.4 Indústria de alimentos e bebidas

A utilização de enzimas como aditivos em alimentos e bebidas é algo bem comum, não só pela degradação orgânica do catalisador, mas principalmente, pela mudança organoléptica atribuída aos produtos (COLLADOS et al., 2020). Na verdade, a implementação de enzimas para a produção de segmentos alimentícios tradicionais é relatada a milhares de anos, sendo que com advento biotecnológico, os biocatalisadores passaram a ocupar um papel ainda mais importante, contemplando inclusive, em menores custos na produtividade.

Além disso, com a necessidade de contemplar os mais diversos ambientes de processamento de alimentos, e atender ao desenvolvimento de novos produtos alimentares, constata-se a elaboração de novas alternativas de obtenção e produtividade destes catalisadores orgânicos; a exemplo de enzimas aprimoradas como proteases, lipases, que apresentam proeminente atividade catalítica (ZHANG, HE e SIMPSON, 2018). Muitos desses avanços foram obtidos através de esforços na área de metagenômica, DNA recombinante e técnicas de engenharia de proteínas, os quais foram determinantes para a aquisição de alimentos mais densos em nutrientes, extração de compostos bioativos, e redução dos riscos de segurança em alimentos (ZHANG, HE e SIMPSON, 2018).

Como se nota, são muitas as aplicações e avanços alcançados pela implementação de moléculas enzimáticas em plantas industriais, sobretudo, na capacidade de metabolizar os seus substratos de maneira seletiva, com rendimento energético bem acima dos processos não catalisados. Além do mais, a sua utilização consegue reverter em níveis consideráveis a contaminação dos subprodutos gerados, já que que sua estrutura orgânica pode ser facilmente degradada, sem ocasionar danos ao ecossistema local.

Na opinião do professor João Furtado, da Universidade de São Paulo (USP) em encontro com representantes dos principais produtores de enzima em nosso país (EMBRAPA, 2015) "a indústria de enzimas é importante não pelo tamanho,

mas porque desempenha um papel chave para uma série de atividades econômicas". Sendo assim, "dar atenção a essa indústria é fundamental para um país que quer utilizar seus recursos naturais, gerando valor agregado de forma sustentável", enfatizou.

No mesmo encontro, o coordenador-geral de Biotecnologia, Energia e Tecnologias da Informação e Comunicação da Secretaria de Inovação do Ministério do Desenvolvimento, Indústria e Comércio Exterior, Luciano Cunha de Souza, enfatizou que dispor de matéria-prima abundante e com baixo custo é um forte diferencial para países se destacarem na produção de enzimas e; que o nosso país, em comparação com outras economias globais, aparece como um forte candidato.

### **2.3 Proteases**

Os seres vivos têm como característica em comum, ainda que sendo de diferentes reinos; o processamento de reações bioquímicas intermediadas por enzimas catalíticas, de forma que sem elas, não seria possível a manutenção da vida (COX, DOUDNA e O'DONNELL, 2012). Existem na atualidade uma infinita gama de enzimas catalogadas, as quais se distinguem quanto a sua função, tamanho e estabilidade química (Tabela 1). Estas por sua vez, alcançam como ponto de convergência, a sequência fundamental de resíduos de aminoácidos, que a depender da cadeia lateral, poderão ser quimicamente enquadrados como aminoácidos aromáticos (Fenilalanina, Tirosina, Triptofano), aminoácidos alifáticos (Glicina, Alanina, Prolina, Valina, Leucina, Isoleucina, Metionina) (HARVEY e FERRIER, 2012), aminoácidos carregados positivamente (Lisina, Arginina, Histidina), aminoácidos carregados negativamente (Aspartato, Glutamato) e aminoácidos não carregados (Serina, Treonina, Cisteína, Asparagina, Glutamina) (CAMPBELL, 2003).

Dentre estas classes de enzimas, as de maior representatividade biotecnológica na atualidade são as hidrolases, enzimas com a capacidade química de clivar ligações covalentes através da adição de moléculas de água. Fazem parte deste grupo as lipases (EC 3.1), celulasas (EC 3.2), amilases (EC 3.2) e proteases (EC 3.4), sendo que esta última, abrange por si só, cerca 60% do total de enzimas comercializadas no setor industrial (YOUNES et al., 2015). Tais moléculas agem especificamente nas ligações peptídicas de proteínas e peptídeos e, estão

presentes de forma universal em todos os seres vivos, representando cerca de 2% do total de proteínas existentes em todos os organismos (SILVA, 2013). Semelhantemente, Gurumallesh et al., (2019) reportaram que nos seres humanos, essas hidrolases chegam a corresponder 500 diferentes enzimas, de modo a constituir um número estimado em 2% de todo o genoma humano.

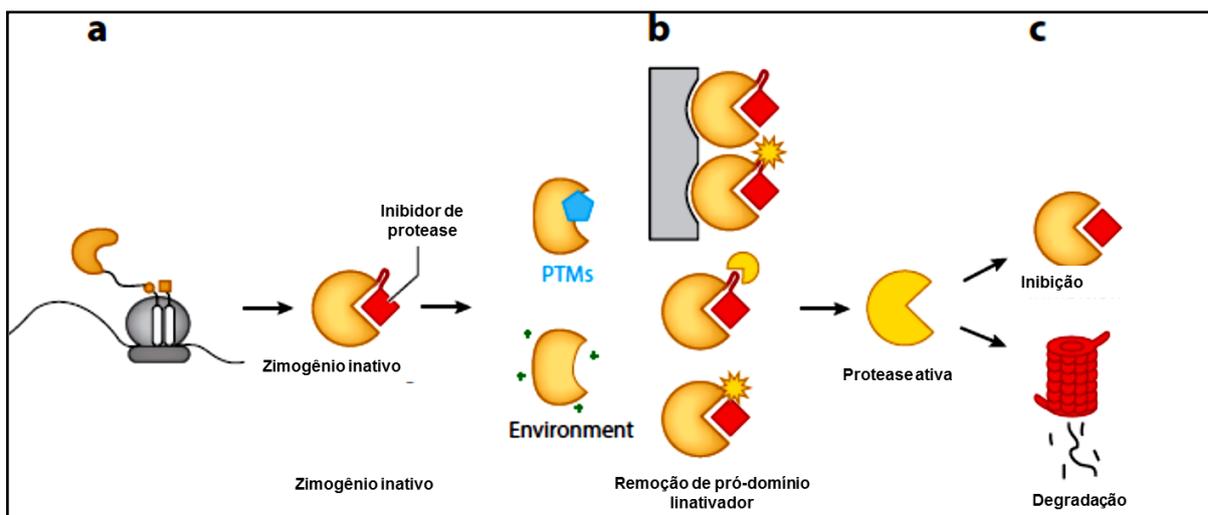
A atividade proteolítica é fundamental para a sobrevivência, portanto, não é de surpreender que todos os organismos vivos expressem essas moléculas. Com a ampla diversidade de isoformas e moléculas homólogas, constituem um excelente mecanismo de ataque e defesa, seja como proteínas de superfície, moléculas secretadas, enzimas digestivas, veneno de glândulas, látex vegetal, entre outras manifestações (PATEL, 2017).

A renovação de proteínas é um importante processo em sistemas vivos. Uma vez que as proteínas cumprem seus propósitos, elas devem ser degradadas, de modo que os aminoácidos constituintes possam ser reutilizados em vias anabólicas. Além disso, as proteínas adquiridas por meio da dieta têm de ser degradadas a peptídeos e aminoácidos para melhor absorção intestinal (STRYER et al., 2008). Sob esses aspectos, as proteases são liberadas em meios intra e extracelulares, agindo em vias metabólicas, vias de sinalização celular, assim como na digestão de proteínas.

Esse tipo de diversidade funcional, vinculada às características estruturais, faz com que essas moléculas assumam participação diferentes setores. Segundo Li et al., (2013) a sua projeção poderá alcançar potencialidades científicas ainda maiores das observadas até o momento. Isso; por sua vez, é permitido pelo grande avanço científico da comunidade acadêmica, de forma que a sua aplicabilidade saiu da esfera industrial, mas incorporando, também; preponderantes participações para terapia de algumas patologias (LI et al., 2013).

Parte das proteases são traduzidas a partir do RNAm, na forma inativa (zimogênio) e, após ativação por proteólise parcial, é que elas conseguem efetuar suas funções catalíticas. Na verdade, se trata de pró-domínios inibitórios, os quais deverão ser removidos, para que a molécula realize perfeitamente a função biológica (SANMAN e BOGYO, 2014). As enzimas que não são sintetizadas com os pró-domínios inibitórios, por outro lado, necessitam da ligação a cofatores específicos, ou mesmo, de uma modificação pós-traducionais (PTMs) (Figura 3).

Figura 3: Mecanismo de ativação de proteases

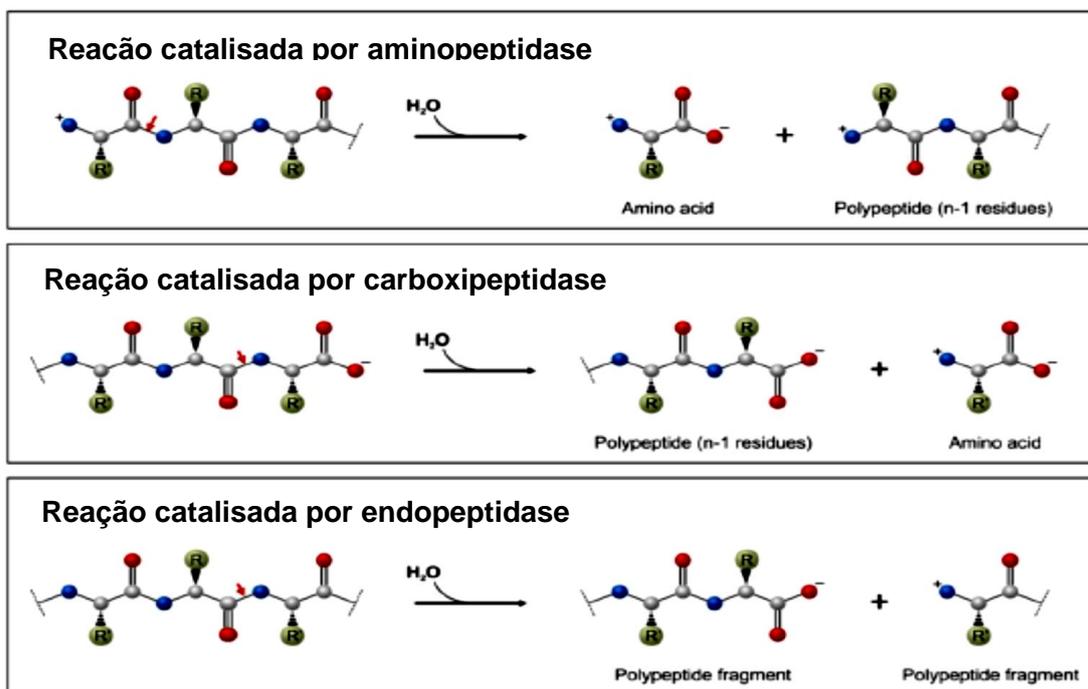


Fonte: Adaptado de Sanman e Bogyo. 2014

Conforme esquematizado na figura, as proteases que são traduzidas na forma de zimogênio (A) podem ser ativadas por diferentes mecanismos, como a variação do pH, modificações pós-traducionais, ligação a cofatores e, por fim; a excisão do domínio inibitório (B). É importante mencionar que a clivagem do domínio inibitório pode ocorrer em um complexo de sinalização macromolecular (B-topo), pela ação de outra protease individual (B-centro), ou pela autocatálise (B-inferior). Cada tipo de mecanismo citado, estará envolvido em processos biológicos específicos, mas que após a ativação, a molécula só perderá a atividade, quando estiver associada a um inibidor endógeno, ou pela degradação induzida pelos proteossomos (C) (SANMAN e BOGYO, 2014).

A depender do sítio de ação no substrato, as proteases podem ser classificadas em endopeptidases e exopeptidases. As exopeptidases agem preferencialmente nas extremidades C (Carboxipeptidases) ou N (Aminopeptidases) da cadeia polipeptídica enquanto que as endopeptidases hidrolisam ligações peptídicas alocadas no interior da molécula (MÓTYÁN, TÓTH e TÓZSÉR, 2013) (Figura 4).

Figura 4: Mecanismo de hidrólise das proteases



Fonte: Adaptado de Mótyán, Tóth e Tőzsér, 2013

Embora estas enzimas basicamente clivem ligações peptídicas, existem diferenças entre elas individualmente, no que diz respeito à posição da ligação hidrolisada e, a sequência de aminoácidos adjacentes a essa ligação (VERMELHO et al., 2008). O referido autor ainda cita que por consequência, em 1960 o cientista Hartley propôs um tipo de classificação onde as enzimas seriam divididas de acordo com os grupos químicos do centro ativo envolvidos no mecanismo catalítico. Desta forma, as proteases são atualmente classificadas em seis grandes grupos com base em seus domínios catalíticos: Serino proteases (EC 3.24.21); Treonina Proteases (EC 3.4.25); Cisteíno Proteases (EC 3.4.22); Aspártico Proteases (EC 3.4.23); Proteases Glutâmicas (EC 3.4.19); e Metaloproteases (EC 3.4.24) (DEL ROSSO, 2013 e SRILAKSHMI, et al., 2015).

### 2.3.1 Aplicações biotecnológicas

O uso de enzimas em processamentos tecnológicos é datado de muitos anos, sendo que as várias aplicações das enzimas conhecidas hoje, são resultados de grandes investimentos, principalmente nas quatro últimas décadas, as quais estão associadas a implementação da biotecnologia moderna. Na verdade, a biocatálise surge como uma ferramenta otimizada, através da redução no tempo de

processo, concentração das etapas operacionais, e máxima especificidade aos substratos (CHOI, HAN e KIM, 2015)

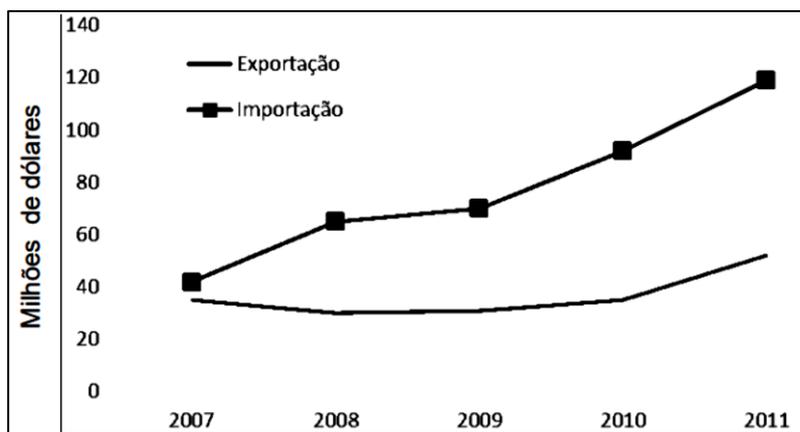
É importante salientar que essa evolução se deu pela contribuição mútua de diferentes linhas de pesquisa. A saber, exploração genética, associada às estratégias de recombinação gênica, assim como os avanços na área da proteômica, onde foi alcançado maior esclarecimento sobre as funções estruturais de cada macromolécula, assim como a ênfase em estratégias de purificação (ZHANG, HE e SIMPSON, 2018).

Sabe-se que a maior parte da comercialização envolvendo a produção de enzimas está centrada na manipulação de proteases e, o sucesso no uso destas moléculas, se deve a fatores como maior degradação, quando comparadas aos catalisadores sintéticos, elevada atividade catalítica, seletividade aos substratos específicos, assim como a diversidade de produção (GURUMALLESH et al., 2019). Por outro lado, sobre os benefícios econômicos, percebe-se que a adequação destas proteínas a insumos processuais favorece em grandes proporções, a economia local, principalmente pelo valor atribuído a molécula comercializada.

Em 2007, o mercado de enzimas era estimado em 2,3 bilhões de dólares anuais, com 60% deste valor correspondente às enzimas proteolíticas, sendo 40% de fontes microbianas (ARRUDA, 2017). O mercado mundial pode ser dividido em três segmentos: enzimas técnicas, destinadas a indústria têxtil e produtos de limpeza; enzimas para alimentos e bebidas e, enzimas para ração animal (SOUZA, 2012). Em 2011 este mercado movimentou 3,5 bilhões de dólares, sendo 1,3 bilhão em enzimas técnicas, 1 bilhão na indústria de alimentos e bebidas e 1,2 bilhão em demais segmentos (MORGADO, 2013).

Os Estados Unidos responderam em 2006 por 34% do mercado de enzimas, com receita de US\$ 394 milhões, com potencial de alcançar no ano de 2013 US\$ 749 milhões. O mercado brasileiro, por outro lado, é essencialmente importador de enzimas industriais. Segundo dados do Ministério de Desenvolvimento, Indústria e Comércio Exterior, no ano de 2011 as importações chegaram a US\$ 119 milhões e, as exportações US\$ 52 milhões (ARRUDA, 2017). Ainda de acordo com a fonte, de 2007 a 2011 as exportações brasileiras cresceram moderadamente, enquanto que as importações triplicaram (Figura 5).

Figura 5: Importações e exportações de enzimas no Brasil (MDIC, 2012)



Fonte: Adaptado de Arruda, 2017

Sobretudo, tem-se que o Brasil possui um enorme potencial para produção de enzimas, devido a dois principais fatores: a abundância em matéria orgânica a ser utilizada como substrato de baixo custo para fermentações, como palha de arroz, soro de leite, bagaço de cana e, a enorme diversidade biológica, com a descoberta de novos microrganismos produtores de enzimas de interesse industrial (SOUZA, 2012).

### 2.3.2 Proteases na indústria de detergentes

Os detergentes são substâncias que mimetizam a tensão superficial de um líquido, sendo estes compostos, também considerados tensoativos (SILVA et al., 2011). Estas substâncias são produtos sintéticos produzidos a partir de derivados do petróleo, e começaram a ser produzidos comercialmente a partir da segunda guerra mundial, devido à escassez de óleos e gorduras necessários para fabricação de sabões (SILVA et al., 2011). A estrutura química das moléculas de detergentes possui como similaridade a constituição de um sal orgânico, com uma longa cadeia alquílica hidrofóbica e, uma extremidade hidrossolúvel. Assim, as moléculas de detergentes são classificadas como anfipáticas, por possuírem uma região polar (hidrossolúvel) e outra apolar (não solúvel). Esse arranjo molecular faz com que as manchas de gordura, geralmente enriquecidas de conteúdo proteico, sejam retiradas e engaioladas pela porção alquílica do detergente, onde posteriormente serão retiradas através do fluxo de água.

Conforme discutido anteriormente, os detergentes comerciais mais simples são formados por surfactantes e agentes estabilizadores, que em conjunto,

favorecem a descoloração dos tecidos, evita a produção excessiva de espuma, facilita a retirada de sujeira das roupas, reduz o efeito de encardimento e, disfarça o mau odor dos demais componentes do produto (SINGH et al., 2018).

A partir da década de 60, passou-se a incrementar nessas soluções enzimas proteolíticas, as quais atuavam em manchas específicas ao degradarem os resíduos orgânicos de origem proteica, permitindo assim, a substituição, ou a redução, de produtos cáusticos, ácidos e solventes tóxicos, que agredem o meio ambiente e promovem o desgaste dos tecidos e equipamentos (MITIDIERI et al., 2002). Na verdade, os detergentes que recebem hidrolases como um dos constituintes, recebem o nome de detergentes biológicos, sendo destinados à limpeza de caldeiras em grandes indústrias, rede hospitalar ou até mesmo nas atividades domésticas (SRILAKSHMI et al., 2015). Estatísticas apontam que de 25% a 30% das enzimas comerciais são implementadas na fabricação de detergentes, com maior destaque as enzimas proteases e amilases (GURUMALLESH et al., 2019).

As principais vantagens em se utilizar biocatalisadores como aditivos em detergentes são: a alta economia energética e baixa emissão de CO<sub>2</sub> (visto ser possível lavagens a baixas temperaturas), por substituírem outros compostos como agentes surfactantes e por serem biodegradáveis. Acredita-se que o uso destes materiais modificados favorece a lavagem de roupas a 30, em vez de 40 ou 60°C, possibilitando uma economia energética e redução de emissão de CO<sub>2</sub> na Europa de 12 milhões de toneladas, valor equivalente a emissão de 3 milhões de automóveis (www.novozymes.com.br, 2015).

Apesar das proteases poderem ser obtidas de diferentes fontes biológicas, as mais utilizadas como aditivos em detergentes são aquelas extraídas de bactérias. Estima-se que a sua implementação ocorreu em meados dos anos 60, por meio da utilização de *Bacillus amyloliquefaciense* e *Bacillus licheniformis* (MAURER, 2004). Atualmente, os microrganismos são responsáveis pela maior parte da produção mundial de enzimas, mas com toda a exigência em eficiência catalítica e, rentabilidade no processo de produção, a descoberta por novas fontes biológicas se mostra de grande interesse.

Em decorrência desta tendência mercadológica; o Brasil, em conformidade com outros países, passou a exercer grande investimento tecnológico, com a finalidade de otimizar seus produtos, assim como aprimorar a eficiência deles.

Esses avanços se deram em diferentes escalas e setores industriais e, com relação ao enfoque desta seção, destaca-se que aproximadamente 80% dos detergentes comercializados apresentam pelo menos uma enzima proteolítica como incremento inovador e, obviamente, respaldando em eficiência imensuravelmente superior aos demais produzidos de forma tradicional ([www.novozymes.com.br](http://www.novozymes.com.br), 2015).

### 2.3.3 Proteases na indústria alimentícia

O uso de proteases em processos industriais destinados à fabricação de alimentos e bebidas são uns dos mais observados. Como exemplo, cita-se a fabricação de cervejas, maturação de queijos, amaciamento de carnes, produção de hidrolisados funcionais, panificação, produção de adoçantes artificiais e, na recuperação/aproveitamento de resíduos e subprodutos (SRILAKSHMI et al., 2015). Entre os efeitos positivos que se espera no processamento de alimentos, há aqueles relacionados com o valor nutricional e funcional, incluindo maior absorção, modificações sensoriais (textura e sabor) assim como melhoria na capacidade antioxidante e redução de compostos alergênicos (VAN BOEKEL, 2010).

No início, quando a enzimologia estava ainda em ascensão, as estratégias escolhidas como forma de modificação das propriedades funcionais das proteínas eram através de tratamentos com substâncias ácidas, que por sua vez, ocasionaram alterações químicas em parte das moléculas constituintes (THYS, 2004). Em contrapartida, o uso inovador de enzimas proteolíticas assumiu inúmeras vantagens, quando comparado a esses outros agentes, as quais se destacam: especificidade, ausência de toxicidade e baixas concentrações. Na realidade, a hidrólise proteica é uma estratégia imposta com a finalidade de agregar valor, funcionalidade e ampliação do leque de aplicações para materiais de pouca utilização convencional, subprodutos e resíduos da indústria alimentícia (ZHANG, HE e SIMPSON, 2018).

Sob aspectos nutricionais, representa a oportunidade de conferir textura a proteína, alterar a capacidade espumante, de coagulação e emulsificação, assim como remoção de sabores e odores indesejáveis (LLORENTE et al., 2014). Além do mais, não altera o valor nutricional do composto, sendo as modificações ocasionadas durante o processo decorrentes da maior ou menor especificidade da enzima pelo substrato.

A ação hidrolítica nas moléculas de proteína faz também com que os peptídeos e aminoácidos gerados assumam maiores níveis de solubilidade. Isto, por sua vez, se deve ao fato de os produtos da hidrólise serem menores, quando comparados com a proteína de partida, assim como maiores quantidades de grupos passíveis de sofrerem o efeito de solvatação. Segundo Zhao et al., (2011), o tratamento enzimático com alcalases de um extrato proteico de amendoim, resultou no aumento da solubilidade do material, ao passo que favoreceu uma diminuição no critério de hidrofobicidade da amostra. Outros artigos também comprovaram os mesmos resultados (CHEN, 2012).

Uma das aplicações inovadoras do uso de proteases está também relacionada a hidrólise de proteínas de soja. Estudos apontam que muitas das propriedades fisiológicas e funcionais das proteínas estão associadas a peptídeos biologicamente ativos, que são codificados na sequência primária de suas proteínas parenterais (RIZZELLO et al., 2016). Eles são oriundos da hidrólise de macromoléculas proteicas, com sequências de aminoácidos bastante particular. Hoje já se conhece inúmeras correlações da ação destes com o melhor funcionamento fisiológico: ação cardiovascular nos sistemas imunológico, nervoso e digestivo (HERNANDEZ-LEDESMA, 2011). Basicamente, o processo metabólico envolvido na formação de peptídeos bioativos oriunda da ação de proteases, tanto aquelas envolvidas em processos digestivos, quanto as participantes da fermentação (TAVANO, 2013).

Coscueta et al., (2019) verificaram o aumento bem significativo na formação e estabilidade de peptídeos bioativos, a partir de proteínas de soja; ressaltando a importante participação enzimática no enriquecimento nutricional de produtos nutricionais. Ainda nessa perspectiva, Liang et al., (2020) mostraram que o tratamento de proteínas da soja com biocatalisadores resultou numa maior formação de espumas e melhoramento nas propriedades interfaciais, o que estima a sua aplicabilidade para a manipulação de alimentos aerados.

Outro importante uso de proteases em insumos alimentícios provém dos processamentos de leite e seus derivados, principalmente aqueles destinados a coagulação. Estimativas apontam que na atualidade, cerca de 816 milhões de toneladas de leite são produzidas anualmente em todo o mundo e, com uma média de consumo de aproximadamente 116,5kg por habitante (SIQUEIRA, 2019). No Brasil a produção de leite cresceu 271% entre os anos de 1974 e 2017, ao ponto de

o país saltar da 10ª posição para o 4º maior produtor no mundo (SIQUEIRA, 2019). De acordo com o autor, essa produtividade se encontra fragmentada em diferentes segmentos comerciais, mas que de modo majoritário, a comercialização do leite longa vida e produção de queijos detêm mais de 50% de toda cadeia produtiva.

A preparação enzimática mais conhecida utilizada pelo setor lácteo é o coalho (ou renina) nome dado às preparações comerciais contendo proteases ácidas extraídas de tecidos animais (FOOD INGREDIENTS BRASIL, 2011). Inicialmente, as proteases existentes no coalho clivam a k-caseína numa região específica da molécula (ligação peptídica entre os aminoácidos fenilalanina e metionina) (BEY et al., 2018) de modo que a estrutura nativa da proteína é desfeita, levando como consequência, a sua menor solubilidade (BADGUJAR, MAHAJAN, 2014). Portanto, a coagulação do leite corresponde à formação de um coágulo firme (insolúvel), obtido através de modificações físico-químicas das micelas de caseína, em tempo determinado (FERNANDES, 2020).

Devido a fatores como o aumento da produtividade, o alto custo do coalho, disponibilidade limitada, requisitos religiosos e, hábitos alimentares; alguns países têm incentivado a disseminação de pesquisas que visem identificar e disseminar a utilização de materiais alternativos destinados à produção de queijo (BEY et al., 2018) a exemplo da tecnologia recombinante com micro-organismos e, principalmente, a investigação de peptidases de origem vegetal (MAZORRA-MANZANO et al., 2013; DE FARIAS et al., 2019).

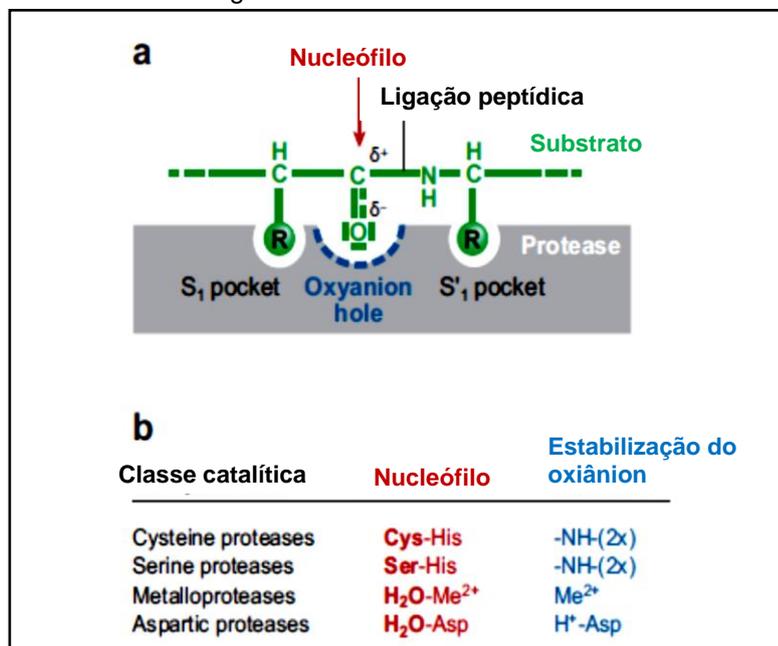
#### 2.3.4 Proteases em fontes vegetais

Foi visto em momentos anteriores que além da participação digestiva, as proteases também assumiram importantes papéis no sistema regulatório. Em espécies vegetais, estas moléculas também revelam fundamental importância, agindo seletivamente na liberação de aminoácidos e peptídeos funcionais, regulação proteica, regulação evolutiva (senescência) e, na defesa contra seres patogênicos (HOORN, 2008; CHINNADURAI, KRISHNAN e PERUMAL, 2018).

Assim como ocorrem em enzimas de vertebrados, as proteases produzidas por células vegetais possuem a capacidade de hidrolisar ligações peptídicas de proteínas, agindo seletivamente em porções C-terminal e N-terminal, através do ataque nucleofílico da carbonila (ligação peptídica) e, posterior estabilização do oxiânion (Figura 7-a). A depender da forma como esse ataque ocorre e, dos grupos

químicos mais participativos, podemos classificar as moléculas como sendo pertencente à família das Cisteíno, Serino, Aspártico e Metaloproteínases (Figura 6-b).

Figura 6: Mecanismo de clivagem enzimática



Fonte: Adaptado de Van Der Hoorn, 2008

Com mais de 200 membros, as proteases séricas são as maiores classes de enzimas proteolíticas encontradas em espécies vegetais, divididas em 14 famílias, pertencentes a 9 clãs evolutivamente relacionados entre si. As famílias S8, S9, S10 e S33 são as de maior representatividade, com 60 membros cada uma delas (VAN DER HOORN, 2008).

Comparado com as proteases de vertebrados, as enzimas produzidas por plantas apresentam menor incidência na utilização em processos industriais, sendo que os seus relatos literários, são datados de milhares de anos, como ilustrado nos escritos homéricos, em que retratavam a utilização do látex da figueira, como agente coagulante de leite para a fabricação de queijo (FEIJOO-SIOTA e VILLA, 2010).

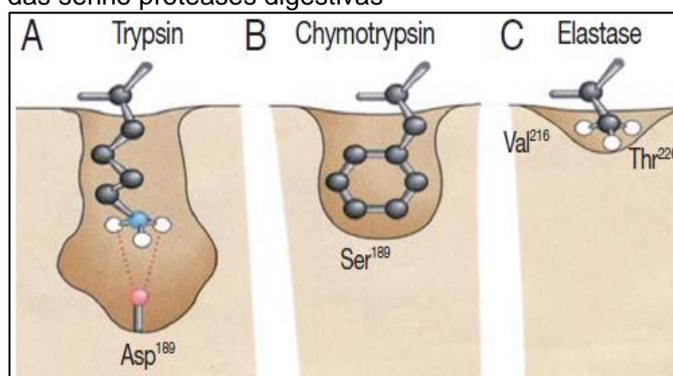
O grande interesse em utilizar processos bioquímicos em escala industrial é que na maior parte dos casos, o custo de produção e, agressão ambiental, tende a ser bem inferior, em comparação com as metodologias inorgânicas e, de tratamentos mecânicos. Por outro lado, por influência da produção em larga escala, ou mesmo pelo baixo custo de produção, as proteases de origem vegetal tiveram seu espaço industrial decrescido, ao passo que a utilização de enzimas purificadas de micro-organismos cresceu exponencialmente (FEIJOO-SIOTA e VILLA, 2010).

Entretanto, mesmo com esse desequilíbrio mercadológico, o número de trabalhos realizados com a finalidade de purificar serino proteases tem revelado forte importância, principalmente pelo fato de não necessitarem de agentes redutores e quelantes como aditivos, e por se mostrar estável em expressiva faixa de pH e temperatura (LI et al., 2018).

### 2.3.5 Tripsina

De todas proteases mencionadas na seção anterior, as serino proteases são amplamente estudadas, por estarem envolvidas em vários processos fisiológicos, tais como a digestão, apoptose, transdução de sinal, controle do ciclo celular e, coagulação do sangue (GOHARA e DI CERA, 2011). As serino proteases são assim denominadas por possuírem um mecanismo catalítico que envolve um resíduo de serina ativado, particularmente reativo em seu sítio catalítico (MINAYA, 2012). Além disso; enzimas enquadradas nessa categoria, possuem em comum a participação de outros aminoácidos, que são a histidina (His) e aspartato (Asp) (YANG, 2015). A depender da especificidade com seus substratos, as serino proteases digestivas podem ser subdivididas em três categorias: tripsina, quimotripsina e elastase (Figura 7).

Figura 7: Subdivisão das serino proteases digestivas



Fonte: Yang, 2015

A tripsina contém um resíduo de aspartato carregado negativamente no sítio ativo da molécula, o qual favorece a hidrólise de ligações peptídicas na extremidade carboxiterminal de resíduos de lisina (Lys) e arginina (Arg), aminoácidos esses carregados positivamente.

As enzimas, assim como as demais proteínas são inteiramente dependentes da estrutura primária de sua cadeia polipeptídica, de modo que uma única

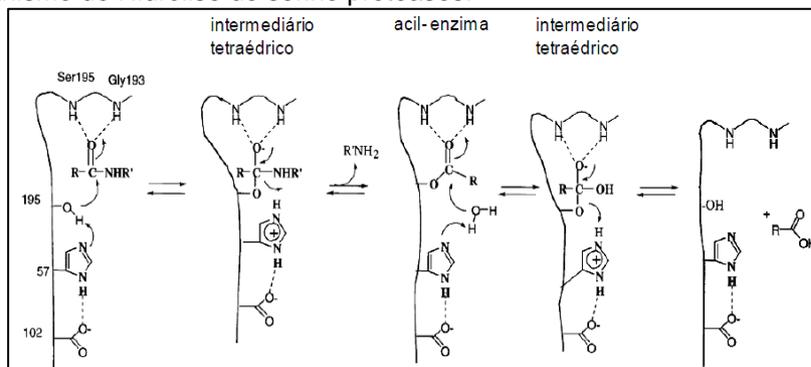
modificação num resíduo de aminoácido, poderá culminar em uma drástica alteração funcional.

Com relação a hidrólise de ligações peptídicas dos resíduos anteriormente citados, a ocorrência de prolina nas regiões adjacentes a estes aminoácidos dificulta o acesso do substrato ao sítio ativo da tripsina ([www.novozymes.com.br](http://www.novozymes.com.br), 2015), já que se trata de um aminoácido mais rígido, tornando a estrutura menos específica ao estado de transição do complexo enzima substrato.

A quimotripsina, por sua vez, age seletivamente em resíduos hidrofóbicos como o triptofano (Trp), fenilalanina (Phe) e tirosina (Tyr). Por fim, tem-se a elastase, que por seu sítio catalítico ser menor que os da tripsina e quimotripsina, age preferencialmente em aminoácidos pequenos como alanina (Ala), glicina (Gly) e valina (Val) (YANG, 2015).

O mecanismo de hidrólise envolvendo serino proteases podem ser observado por meio da Figura 8. Através do mecanismo, é possível verificar que o ataque nucleofílico ocorre a partir da hidroxila do aminoácido serina, na posição 195. É importante mencionar que essa hidroxila protonada precisa ser “ativada”, caso contrário, formaria um intermediário extremamente instável (oxigênio com três valências acomoda carga parcial positiva, extremamente instável nesse elemento eletronegativo). Assim, a aproximação deste aminoácido com o resíduo de histidina na posição 57 faz com que a hidroxila da serina seja desprotonada, tornando este oxigênio da hidroxila com carga elétrica parcialmente negativa.

Figura 8: Mecanismo de Hidrólise de serino proteases.



Fonte: Gerais-Brasil, 2009

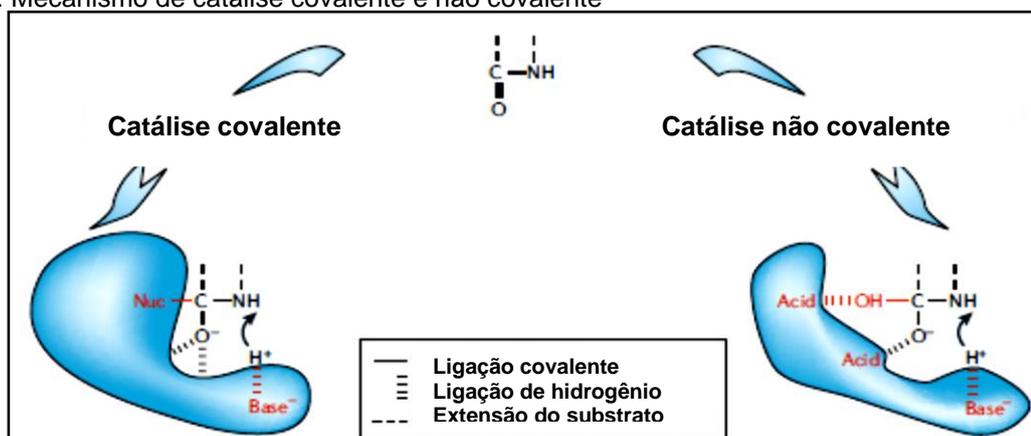
Em termos de reatividade, esta carga negativa em um átomo eletronegativo, como o oxigênio, faz com que a energia do orbital molecular ocupado (HOMO) deste resíduo de aminoácido aumente consideravelmente, tornando-o ainda mais propício ao ataque nucleofílico (CAREY, 2007). Por si só, o anel imidazólico da histidina

possui expressiva basicidade, em decorrência do par de elétrons livres em um dos átomos de nitrogênio. No entanto, ao se aproximar do terceiro aminoácido envolvido na tríade catalítica, aspartato (posição 102), o mesmo pode efetuar uma ligação de hidrogênio com a histidina, o que acarretaria em um aumento no pKa para a mesma, tornando-a ainda mais básica e, conseqüentemente, promovendo uma interação mais efetiva entre ela e a hidroxila da serina.

À medida que o substrato se aproxima da tríade catalítica, o oxigênio da hidroxila efetua um ataque nucleofílico no grupo carbonila, formando um intermediário tetraédrico e, o oxigênio da carbonila assume uma carga parcial negativa. Esta carga por sua vez, pode sofrer efeito estabilizador por meio de ligações de hidrogênio de outros aminoácidos posicionados num bolsão da enzima denominado de oxiânion (STRYER, BERG e TYMOZKO, 2006). O intermediário formado é extremamente instável e, ao restabelecer a ligação dupla da carbonila, ocorre uma ruptura no intermediário entre o carbono e o grupo amino, facilitada também pela protonação do aminoácido histidina. A água que entra é também desprotonada, a hidroxila gerada ataca a carbonila, formando mais uma vez o intermediário tetraédrico.

Por fim, a ligação dupla da carbonila é restabelecida, regenerando o estado inicial da enzima para mais uma reação. Na verdade, esse tipo de mecanismo reacional mostrado é comum para catálises covalentes, em que a histidina, participa na reação como uma base de Lewis. Por outro lado, aquelas realizadas por metaloproteínas e, proteases aspárticas, são intituladas como catálises não covalentes, tendo como ácidos e bases os grupos glutamato e zinco (TURK, 2006) (Figura 9).

Figura 9: Mecanismo de catálise covalente e não covalente

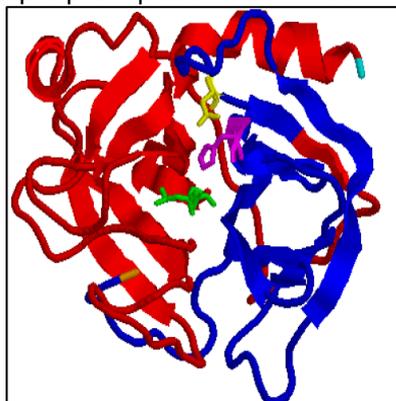


Fonte: Adaptado de Turk, 2006

Nos seres humanos, a tripsina é produzida no pâncreas, na forma inativa, chamada de tripsinogênio (zimogênio). Sua molécula (Beta) consiste em uma única cadeia polipeptídica, formada por dois domínios de estruturas similares, unidos de forma assimétrica, cujas interfaces estão inseridas os resíduos de aminoácidos catalíticos (DEVLIN, 2011) (Figura 10).

O primeiro domínio é representado em azul (1-105aa), seguido do outro domínio em vermelho (106-223aa). O N-terminal da molécula é mostrado em laranja, e C-terminal em cor azul claro. Finalmente, mostra-se a tríade catalítica: Ser (amarelo); His (lilás) e Asp (verde) (GERAIS-BRASIL, 2009).

Figura 10: Estrutura tridimensional da  $\beta$ -tripsina pancreática bovina



Fonte: Gerais-Brasil, 2009

Durante a digestão, quando os alimentos previamente degradados pela pepsina chegam ao intestino, ocorre a liberação de tripsinogênio, onde sofre a ação hidrolítica da enteropeptidase, liberando na forma ativa a tripsina (DEVLIN, 2011), a qual propicia a continuidade da hidrólise das proteínas previamente digeridas, bem como promove a ativação de outras moléculas proteicas.

Esse tipo de ativação é estabelecido pela exposição do sítio catalítico da molécula, que até então, encontrava-se impedido. Em se tratando de outra proteína, a definição comumente escolhida pelos bioquímicos ao se referirem aos precursores são: pró-proteínas ou pró-enzimas, dependendo da natureza da molécula (NELSON e COX, 2013).

Para o tripsinogênio, a ação hidrolítica da enteropeptidase desencadeia a remoção do hexapeptídeo a partir da extremidade N-terminal, H<sub>2</sub>N-Val-Asp-Asp-Asp-Asp-Lys (DEVLIN, 2011). sendo que recentemente, Ogawa et al. (2015) verificaram o efeito auto ativador do tripsinogênio intermediado por interação

específica com carboidratos. Com esse estudo, os pesquisadores puderam certificar-se de que a ativação secundária do tripsinogênio, desencadeada pela ação direta de moléculas de tripsina ativas, estaria sofrendo efeito regulatório a partir de moléculas glucanares, associadas a forma inativa (zimogênio). Além disso, puderam concluir que a ação inibitória estaria atribuída não necessariamente a tripsina ativa, mas através da mudança estrutural do tripsinogênio, visto que a taxa de hidrólise da tripsina ativa não mostrou alterações após incubação com os carboidratos estudados.

É de fundamental importância que a tripsina seja disponibilizada apenas nos momentos de interesse fisiológico, caso contrário, desencadearia o efeito nocivo denominado de pancreatite (BRANDL et al., 2016). Desta forma, acredita-se que a associação intermolecular do tripsinogênio com moléculas glicanas representa mais um novo mecanismo endógeno, destinado a regulação indireta contra a hidrólise intermediada por tripsina (auto ativação do zimogênio).

Por abranger importantes processos metabólicos, sejam em bactérias ou vertebrados, estudos destinados a purificação e caracterização de tripsinas tem crescido de forma bastante considerável. Além do isolamento em si, análises mais refinadas puderam também testificar importantes características acerca da estrutura primária, amplo conhecimento de suas atividades, assim como estudos cinéticos destinados ao processo catalítico destas moléculas (DOS SANTOS, 2020).

O manejo alternativo de tripsinas como aditivo em produtos industrializados abrange hoje uma vasta diversificação, tanto farmacológica, análises químicas, quanto na produção de detergentes. Estima-se que neste, a tripsina foi introduzida pela primeira vez em 1913, pelo químico alemão Otto Röhm (HERBOTS et al., 2008), sendo que o primeiro produto disponibilizado no mercado com essa formulação, ocorreu apenas 46 anos mais tarde, produzido por Gebrüder Schnyder e, em 1985, somando cerca de 80% do total de detergentes comercializados (VOJCIC et al., 2015).

O enquadramento de tripsinas como um bom aditivo em detergentes está associado à avaliação de múltiplos fatores. Dentre eles pode-se destacar a ampla ação da tripsina em pH alcalino, assim como em diferentes temperaturas (de baixas temperaturas para fibra sintéticas, e de altas para fibras de algodão). Por fim, destaca-se a sua estabilidade cinética frente aos demais constituintes do produto.

Sobre ações farmacológicas, pode-se citar a contribuição da tripsina sobre efeitos dietéticos na indústria alimentar, o que reflete direta, ou indiretamente num maior estado nutricional, bem como uma terapia alternativa para pacientes com disfunção pancreática (KIM, 2014). Normalmente estas moléculas são obtidas a partir de extratos de pâncreas bovinos e suínos, sendo que a série de epidemias configuradas nos últimos anos tem despertado um estado de alerta por parte dos profissionais da área, tendo em vista o risco iminente de contaminação após administração clínica com esse material.

Como uma das soluções alternativas, tem-se pensado na técnica de recombinação com células vegetais, por exemplo, a partir do milho transgênico (*zeamays*) (WOODARD et al., 2003). No entanto, um dos maiores entraves relacionados a esse estudo refere-se ao custo benefício associado à purificação, podendo atingir cerca de 80% do custo total (TIAN et al., 2011 e XU et al., 2012).

Em estudos desenvolvidos com células de arroz transgênico, Kim et al., (2011) obtiveram 15 mg/L de tripsina de pâncreas bovino até o quinto dia de cultivo das células, compreendendo cerca de 7,5% do total de enzimas secretadas por estas células em meio de cultura.

Em análises químicas, a tripsina purificada é usualmente empregada na espectrometria de massas, como forma elucidativa da massa molecular de proteínas, assim como aferir o sequenciamento de alguns dos peptídeos constituintes. Nesta análise, as bandas das proteínas contidas no gel de eletroforese devem ser retiradas antes de serem investigadas. Em seguida são hidrolisadas por meio de um tratamento enzimático com tripsina. Assim, a depender do perfil de fragmentação, torna-se possível equiparar os resultados obtidos com alguns bancos de dados apropriados e, conseqüentemente, determinar a classe e subclasse da proteína em questão (UPADHYAY et al., 2015; BAJAJ et al., 2015).

De forma preponderante, a biotecnologia visa cada vez mais a otimização, melhor desempenho e; principalmente, o uso de produtos com elevado potencial biotecnológico. Dentre as possibilidades, destaca-se o reaproveitamento de descartes do setor agropecuário, que no nosso país, é responsável pela produção e comercialização de grandes quantidades de biomassa rica em enzimas digestivas.

## 2.4 Inibidores de Proteases

Assim como as reações enzimáticas são utilitárias em aplicações biotecnológicas, a sua inibição, por outro lado, também tem sido alvo de muitas pesquisas e desenvolvimento científico, principalmente como alvos farmacológicos, agindo seletivamente ao sítio ativo da molécula e, com isso, minimizando os efeitos deletérios aos pacientes tratados. Com relação a ação dos inibidores de enzimas podemos dividi-los em reversíveis e irreversíveis. Os inibidores irreversíveis formam uma estável ligação covalente com o sítio ativo da enzima, impossibilitando que esta acelere a processabilidade do substrato. Em contrapartida, aqueles ditos reversíveis (competitivo, misto e não competitivo) interagem com a proteína (enzima) por meio de interações fracas (ligação de hidrogênio, ligação hidrofóbica e iônicas), modificando a estrutura tridimensional da proteína e, com isso, inviabilizando o seu encaixe ao substrato.

Da mesma forma que o comércio internacional de proteases tem alcançado o percentual de praticamente metade do total de enzimas produzidas, a descoberta por moléculas inibitórias tem também mostrado expressivo destaque. Os inibidores de protease (PIs) são tidos como moléculas presentes em praticamente todos os organismos vivos, desempenhando papel significativo em muitos processos biológicos, por regulação das funções proteolíticas de suas enzimas alvo (VAGADIA, VANGA e RAGHAVAN, 2017). Entretanto, para Zhao et al., (2018) a sua maior incidência ocorre em espécies vegetais, sobretudo, nas Fabaceas, cereais, tubérculos e sementes oleaginosas.

Devido à sua capacidade de inibir as proteases, incluindo as do sistema digestivo humano e, reduzir a biodisponibilidade das proteínas, os IPs passaram a ser considerados como antinutrientes (ZHAO et al., 2018). Entretanto, a sua atribuição é ainda mais abrangente, por intermédio de ação preventiva contra uma série de doenças; como câncer, esclerose múltipla, inflamação e Duchenne, distrofia muscular (CLEMENTE et al., 2011; KOBAYASHI, 2013; HERNÁNDEZ-LEDESMA e HSIEH, 2017).

### 2.4.1 Classificação dos inibidores de proteases de origem proteica

De acordo com o sistema digital MEROPS (sistema de banco de dados eletrônico) no ano de 2017, foram confirmados o registro de aproximadamente

13.4011 PIs identificados (RAWLINGS et al., 2018). Os autores ainda reforçam que esse avanço teve como apoio científico os novos estudos de purificação e sequenciamento de suas cadeias polipeptídicas.

Esse grupo de inibidores são organizados em 82 famílias, baseadas em sua homologia da estrutura primária e, são consideradas específicas na sua ação inibitória, contra as cinco principais classes de enzimas proteolíticas: serina, cisteína, aspártico, metaloprotease e treonina protease.

Sobretudo, os IPs de serina e cisteína são os de maior incidência e, os de maior representatividade científica, devido em parte, à sua associação como os principais fatores antinutricionais no armazenamento de plantas, majoritariamente nas sementes e tubérculos. Não obstante, estudos revelam que de maneira endógena, o percentual em massa destas moléculas pode alcançar 2% do total de proteínas no farelo de soja e de 2-10% do quantitativo de proteínas nas sementes de soja (VAGADIA, VANGA e RAGHAVAN, 2017).

A grande maioria dos inibidores de serino proteases agem sob a estequiometria de 1:1, competindo seletivamente pelo mesmo sítio ativo do substrato, através da formação do complexo enzima-inibidor (CABRERA-OROZCO, JIMÉNEZ-MARTÍNEZ, e DÁVILA-ORTIZ, 2013; DIAS, 2017). Por se tratarem de estruturas polipeptídicas, a capacidade inibitória destas moléculas e, sua tipificação dependerá da sequência dos aminoácidos, assim como a maneira com que estes estão organizados tridimensionalmente. No caso dos inibidores de serino proteases, estudos publicados têm mostrado que estas moléculas possuem em comum, uma estrutura com massa variando de 8-24 KDa, os quais estão justapostos ao sítio ativo das hidrolases (ODDEPALLY, SRIRAM e GURUPRASAD, 2013).

Inicialmente, com o pioneirismo destas pesquisas, não se imaginava que “modelos” diferentes de estudo (plantas) poderiam traduzir, em suas respectivas células, moléculas com tamanha semelhança estrutural. Entretanto, na medida que os isolamentos dos inibidores foram sendo realizados e, suas sequências definidas, pode-se concluir que diferentes espécies orgânicas conseguem expressar moléculas homólogas (AVILÉS-GAXIOLA, CHUCK-HERNÁNDEZ e SERNA SALDIVAR, 2018).

De acordo com Zhao et al., (2019), podemos classificar os inibidores de serino proteases como:

- **Tipo Kunitz (SBTI)** uma proteína isolada de sementes de soja, formada por uma única cadeia polipeptídica, e peso estimado em 18 a 24 kDa. A estrutura da proteína também é marcada pela incidência de duas pontes dissulfeto, localizadas entre os aminoácidos Cys 136–145 e Cys 39-86, e seu sítio reativo está localizado em Arg 63 e Ile 64. (ZHAO et al., 2018).
- **Bowman-Birk (BBIs)** IPs séricos que têm peso molecular estimado em 8-10 kDa, com alta densidade de grupos cisteína. Normalmente, essa classe de inibidor necessita dos aminoácidos glicina e triptofano, e interagem por meio de dois domínios homólogos, cada um contendo um local reativo separado (ZHAO et al., 2018).

A inativação de enzimas proteolíticas se dá pela associação intermolecular com estas moléculas e, normalmente, assumem forte estabilidade, quando expostas a variações de pH, temperatura, agentes desnaturantes e proteólise por proteinases. Estas moléculas são encontradas em bactérias, fungos e, animais; no entanto, são mais estudados em famílias de plantas como *Fabaceae*, *Poaceae* e *Solanaceae*, sendo detectadas em órgãos vegetativos, reprodutivos e de reserva (BEZERRA, 2014).

#### 2.4.2 Inibidores de Proteases como Fatores de Proteção de Plantas

As plantas, assim como demais organismos, coevoluiram com micro-organismos, insetos, nematóides, aves e mamíferos, de forma que por intermédio da seleção natural, precisaram desenvolver mecanismo de defesa, capazes de assegurar-lhes a continuidade da espécie, ou mesmo, a manutenção do processo senescente da planta. Em contrapartida, a habilidade desses microrganismos ou herbívoros em adaptar-se aos mecanismos de defesa dos vegetais é que os caracteriza como patógenos ou predadores, respectivamente (TREMACOLDI, 2009).

Estudos apontam que em plantas, os inibidores apresentam variadas funções, podendo atuar como reguladores de proteases endógenas, proteínas de reserva e, como agentes de defesa vegetal contra insetos, micro-organismos e outros animais herbívoros (BEZERRA, 2014).

Até 1976, apenas um inibidor altamente específico (para uma protease microbiana) havia sido isolado de plantas, o inibidor de subtilisina encontrado na

cevada (YOSHIKAWA et al., 1976). Ainda neste ano, foi observado que inibidores de tripsina e quimotripsina presentes em sementes de soja, feijão e também em batata, foram capazes de suprimir a atividade de proteases secretadas por *F. solani* (MOSOLOV et al., 1976) e, ainda, que inibidores da família Bowman-Birk presentes em feijão, suprimiram o crescimento de hifas e a germinação de conídios de *F. solani*, *F. culmorum* e *B. cinerea* (MOSOLOV et al., 1976). Posteriormente, foram publicados demais trabalhos associados, validando a ação de outros inibidores de proteases de plantas sobre enzimas extracelulares, crescimento e, desenvolvimento de microrganismos fitopatogênicos (CRUZ, et al., 2013).

## 2.5 Modelos Biológicos

### 2.5.1 *Crotalaria stipularia* (DESV., 1814) (FARBALES: FABACEAE)

A família Fabaceae é a terceira maior família entre as angiospermas e, a segunda família mais importante economicamente (JUDD et al., 2009). Muitas delas desempenham papel vital na biogeoquímica global, por apresentarem nódulos com bactérias fixadoras de nitrogênio atmosférico (SPRENT, 2001). No Brasil, esta família está representada por cerca de 190 gêneros e 2.100 espécies, que possuem papel de destaque como elemento florístico em diversas formações vegetais, principalmente daquelas pertencentes ao domínio atlântico, onde possuem destacada importância por sua riqueza e abundância (LIMA, 2000).

Compõe esse grupo majoritário, as Crotalárias, caracterizadas por apresentarem porte herbáceo ou arbustivo; folhas digitado-trifolioladas, unifolioladas ou simples; flores com corola predominantemente amarela; estames 10, monadelfos, formando um tubo aberto por uma fenda, anteras dimorfas e legumes inflados (MAGON GARCIA et al., 2013).

Segundo os autores, as espécies são encontradas em diferentes condições ambientais, como áreas próximas a rios, morros litorâneos, restingas, orlas de florestas, campos e cerrados. Além disso, são oportunistas e, muito comum como invasoras de culturas e de locais alterados como, por exemplo, em margem de estradas e pastagens (FLORES e MIOTTO, 2005; LEWIS et al., 2005).

O legume inflado, quando próximo à deiscência (separação espontânea), apresenta as sementes livres em seu interior e, assim; quando agitado produz um som semelhante ao de um chocalho ou ao guizo da cobra cascavel (*Crotalus* sp.)

(MARGON GARCIA et al., 2013). Dessa característica, derivam os nomes populares da maioria de suas espécies, como guizo-de-cascavel, xique-xique e crotalaria (QUEIROZ, 2009), bem como o nome do gênero.

Crotalaria constitui-se em um dos maiores gêneros da família Fabaceae, com cerca de 690 espécies distribuídas em regiões tropicais e subtropicais, principalmente no Hemisfério Sul, sendo mais rico na África e na Índia. Para o Novo Mundo, são citadas por Lewis et al., (2005) cerca de 74 espécies, sendo 59 endêmicas e, destas, 35 são da América do Sul, a maioria das quais, no Brasil. Segundo Burkart (1952), nos neotrópicos, a área natural do gênero, abrange desde o sul dos Estados Unidos até a Argentina e o Uruguai.

Em relação a sua utilidade agroecológica, diversos são os usos citados para suas espécies, como: adubo orgânico; forragem; no combate a nematóides de plantações; em programas de revegetação de áreas contaminadas com substâncias tóxicas (como arsênio empregado na indústria têxtil); na produção de fibras para confecção de papel; na medicina popular e em atividades farmacológicas (BURKART, 1952; POLHILL, 1982; MORRIS, 1997; MEDA e FURLANI, 2005; NARENDER et al., 2005, AHMED et al., 2006a, b, SILVA e et al., 2007; GARRIDO et al., 2008, FELIPE et al., 2009; e ROCHA et al., 2009). Recentemente, também fora divulgado no cenário científico uma importante aplicação biotecnológica do uso de variedades do gênero Crotalaria, no combate ao mosquito *Aedes aegypti*, por meio da atração de libélulas (*Odonata*) as quais agem como predadores naturais do mosquito vetor (PEIXOTO, FUJITA e ROQUE, 2018)

Para esta pesquisa, utilizou-se como modelo de referência a *C. stipularia*, que segundo a Reflora ([http://servicos.jbrj.gov.br/flora/search/Crotalaria\\_stipularia](http://servicos.jbrj.gov.br/flora/search/Crotalaria_stipularia)) possui as especificações taxonômicas muito bem definidas (Tabela 2).

Tabela 2: Classificação botânica da espécie *C. stipularia*

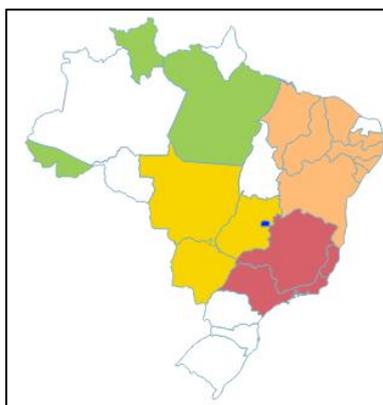
<b>Caule</b>	<b>Folha</b>	<b>Inflorescência</b>
<b>Planta:</b> alt. (m) 0.3-0.5; <b>Ramo:</b> porte prostrado ascendente ou decumbente/ereto; <b>Ramo-pilosidade:</b> seríceo; <b>Ala- interno:</b> amplo	<b>Estípula-forma:</b> ausente; <b>Folha:</b> simples; <b>Pecíolo:</b> ausente; <b>Lâmina-foliar:</b> oblonga/oval, oval-lanceolada, orbicular.	<b>Número de flores:</b> paucifloro; <b>Racemo:</b> laxo; <b>Racemo-posição:</b> opositifolio.
<b>Flor</b>	<b>Fruto</b>	<b>Semente</b>
<b>Bráctea:</b> persistente;	<b>Legume-formato:</b> obovado;	<b>Semente-cor:</b> castanha ócrea

<b>Bráctea-formato:</b> lanceolada;	<b>Legume-cor:</b> preto;	
<b>Calice-forma:</b> bilabiado	<b>Legume-pilosidade:</b> glabro	
<b>Corola-cor:</b> amarela.		

Fonte: [http://servicos.jbrj.gov.br/flora/search/Crotalaria\\_stipularia](http://servicos.jbrj.gov.br/flora/search/Crotalaria_stipularia). Acesso em 02 de junho de 2020

A sua distribuição geográfica no Brasil também está muito difundida, através da confirmação nas regiões: Norte (Acre, Pará, Roraima); Nordeste (Alagoas, Bahia, Ceará, Maranhão, Paraíba, Pernambuco, Piauí, Sergipe); Centro-Oeste (Distrito Federal, Goiás, Mato Grosso do Sul, Mato Grosso); Sudeste (Espírito Santo, Minas Gerais, Rio de Janeiro, São Paulo) (Figura 11).

Figura 11: Distribuição da *C. stipularia* no território brasileiro



Fonte: [http://servicos.jbrj.gov.br/flora/search/Crotalaria\\_stipularia](http://servicos.jbrj.gov.br/flora/search/Crotalaria_stipularia). Acesso em 02 de junho de 2020

Os Domínio Fitogeográficos da espécie estão fragmentados na Amazônia, Caatinga, Cerrado, Mata Atlântica, Pantanal, e em vegetações do tipo: Área Antrópica, Caatinga (stricto sensu), Campo de Altitude, Campo Limpo, Campo Rupestre, Cerrado (lato sensu), Restinga, Savana Amazônica ([http://servicos.jbrj.gov.br/flora/search/Crotalaria\\_stipularia](http://servicos.jbrj.gov.br/flora/search/Crotalaria_stipularia)).

### 2.5.2 *Centrosema plumieri* (BENTH) (FARBALES: FABACEAE)

O gênero *Centrosema* possui distribuição neotropical, sendo bastante frequente em vegetações savânicas e florestais, especialmente no Brasil, onde está representado por 30 espécies, 11 destas endêmicas (SILVA e SILVA, 2018).

A espécie *C. plumieri* pertence à família das *Fabaceae* Lindl, e apresenta distribuição majoritária nas regiões neotropicais - Sul do México, Panamá, Venezuela, Brasil, Paraguai, África tropical, Ásia e norte da Austrália (BOTENY.CZ,

2018). Sua ecologia é de florestas tropicais e em vegetação secundária, florescendo de setembro a março. A sua descrição botânica é marcada pela **Vinha** com caule glabro ou levemente piloso; **folhas** 3-folioladas, com 7,5–20 (–28) cm de comprimento; **stípules** com 0,4-1 cm de comprimento; **pecíolos** 1,9 a 9,5 cm; **folhetos** de 4 a 14 cm de comprimento, 2 a 8 cm de largura, ovados a levemente rômnicos, glabros acima, ligeiramente induzidos abaixo. Inflorescências axilares, várias flores, até 7 cm de comprimento; **flores** de 3,5-5 cm de comprimento, branco com centro púrpura, asas brancas com ápice arroxeadado, glabras; **cálice tubular** com 0,7-1 cm de comprimento, mais largo que longo, dentes a 3 mm de comprimento. Sua fruta é uma leguminosa, com até 20 cm de comprimento, 0,7 a 0,8 cm de largura, esparsamente adulterada pubescente.

Embora nos deparemos com menor número de publicações científicas, utilizando como material de partida a espécie *C. plumieri*, acredita-se que este vegetal se mostra com pujante acervo macromolecular, ao ponto de ser implementado nas mais diversas utilidades biotecnológicas, com por exemplo, no possível combate de insetos pragas.

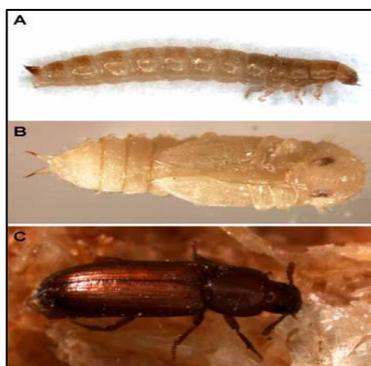
### 2.5.3 Utilização de proteínas no combate ao inseto praga *T. castaneum*

Além dos argumentos supracitados, relacionados à diversidade biotecnológica dos inibidores de proteases, destacamos nesta seção, a possibilidade de utilização destas moléculas no combate a insetos pragas de grãos armazenados e de demais culturas agrícolas (MERIÑO-CABRERA, et al., 2020). Dentre os casos de maior incidência, chama-se a atenção para os danos ocasionados pela espécie *T. castaneum*, comumente denominada de besouro vermelho da farinha, por apresentarem uma coloração castanho-avermelhada (Figura 12) (PERKIM, ELPIDINA, OPPERT, 2016).

O *T. castaneum* é considerado como uma das principais pragas agrícolas, causando perdas econômicas substanciais às mercadorias armazenadas (PERKIN, ELPIDINAT e OPPERT, 2016). O seu dano é relatado nas mais diversas partes do mundo e, que ao longo dos anos, tem apresentado expressiva resistência, quando combatidos com produtos inseticidas (DISSANAYAKA, SAMMANI e WIJAYARATNE, 2020). Estimativas apontam que a ação destas pragas pode comprometer a produção mundial de grãos em até 8% e, que anualmente, cerca de

11 a 26% dos grãos armazenados são destruídos através de sua agressão (PANEZAI, et al., 2019).

Figura 12: *T. castaneum*: (A) fase larva; (B) fase pupa e (C) inseto adulto



Fonte: <https://www.agrolink>. Acesso em 11 de dezembro de 2019

O *T. castaneum* pertence à ordem Coleoptera e, família Tenebrionidae. Em sua morfologia, apresenta um sistema digestivo compartimentalizado, em que na porção anterior do seu intestino, verificamos a ação majoritária de enzimas ácidas, como as peptidases Catepsina L e Cisteína B (VINOKUROV et al., 2009; MARTYNOV et al., 2015). Para alguns pesquisadores, esse tipo de distribuição pode funcionar como um mecanismo evolutivo que estes animais desenvolveram, como forma de defesa contra a ação de inibidores de serino proteases (OPPERT et al., 2010). Após sofrerem a hidrólise das enzimas ácidas, as proteínas e peptídeos remanescentes são processados no intestino posterior, por meio da ação de enzimas alcalinas como tripsinas e quimotripsinas (VINOKUROV et al., 2009).

Em virtude da compartimentalização metabólica e, da participação escalonada das proteases no sistema digestivo do *T. castaneum*, acredita-se que a suplementação de PIs à dieta destes animais pode funcionar como método eficaz no combate dessas pragas (OPPERT et al., 2010) em substituição a utilização de agroquímicos de maior agressão ambiental.

## 2.6 Estratégias de Precipitação de Proteínas

Para que as propriedades e atividades de uma proteína possam ser determinadas, estas devem estar na sua forma pura (NELSON e COX, 2013). Essa purificação deve ser tomada a partir do tecido, célula, ou qualquer outro tipo de material biológico que a proteína de estudo esteja inserida, o que é chamado de extrato bruto (EB) (AUGUSTO, 2012). Nesse processo de extração, a intervenção

mecânica é em alguns casos fundamental, tanto para fragmentação de tecidos, quanto em processos de ultrafiltração, para separar proteínas de suspensões de bactérias e fungos. Nestes casos, é importante que o pesquisador se preocupe com a integridade estrutural da molécula, caso contrário, encontrará dificuldades durante sua análise, ou até mesmo, deixará de realizar o processo, visto que tais procedimentos podem influenciar na catálise realizada (em casos de enzimas), incidindo na forma metodológica mais plausível na identificação da proteína.

Concluído esse procedimento, o próximo passo é a separação do material em diferentes frações, de forma que se consiga concentrar a proteína alvo em uma única fração e, os demais contaminantes, serem gradativamente retirados do meio. Normalmente, o critério levado em conta é a propriedade química da proteína, como tamanho, solubilidade, carga (positiva ou negativa) e, especificidades químicas dos grupos presentes. Ou seja, suas propriedades de interação com outras moléculas. A seguir, são elencadas algumas das principais técnicas de isolamento de proteínas, as quais foram tomadas durante a realização deste trabalho, como embasamento metodológico e experimental.

### 2.6.1 Precipitação salina

Esse tipo de técnica é muito difundido em trabalhos voltados a purificação de proteínas, principalmente pelo baixo custo e, eficiência em minimizar a quantidade de contaminantes na etapa inicial da purificação (MARIAN et al., 2015). Nessa técnica, é muito importante que o sal não provoque perturbações estruturais na molécula polipeptídica que se pretende purificar, caso contrário, poderá acarretar a redução parcial, ou mesmo completa, da atividade biológica que ela desempenha.

Diante das possibilidades elencadas na literatura, adotou-se para essa pesquisa o sulfato de amônio ((NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub> SO<sub>2</sub>), composto químico amplamente utilizado em trabalhos voltados a purificação de macromoléculas, a exemplo de serino-protease do extrato bruto de papaína (MARIÑO BOHÓRQUES et al., 2014). A sua utilização como etapa preliminar na purificação de proteases é algo bastante difundido, independentemente de qual seja o material de partida, seja ele de origem microbiológica, animal ou vegetal.

Para ambos os casos, percebe-se que seu perfil segue como via de regra, a característica estrutural dos próprios aminoácidos presentes. Como exemplo, cita-se o trabalho que reporta a purificação de uma protease extraída das sementes de

*Plodia interpunctella*, com 80% de saturação (JALAI et al., 2015) e, a influência do uso de sulfato de amônio (65% de saturação) na purificação de protease dos frutos de Tamarilo (LI et al., 2018).

#### 2.6.2 Precipitação com solventes orgânicos (acetona e etanol)

Da mesma forma que o fracionamento salino é utilizado como metodologia preliminar; na precipitação de proteínas, observa-se que os solventes orgânicos tem sido alvo de importantes pesquisas voltadas a essa temática. Como exemplo, podemos mencionar a utilização do etanol como agente precipitante de glicosil hidrolases produzidas por *Trichoderma harzianum* (MARIÑO BOHÓRQUES et al., 2014) e, a obtenção de 120,3% da atividade recuperada de inulinase produzida por *Kluyveromyces marxianus* NRRL Y-7571 mediante a precipitação com 55% (v/v) de etanol a 5°C (GOLUNSKI et al., 2011).

Resultados semelhantes são também mostrados quanto ao uso de acetona como agente precipitante de proteínas, a exemplo da maximização na recuperação de proteínas solúveis em água, através da precipitação com acetona (CROWELL, WALL e DUCETTE, 2013); uso de acetona como agente precipitante na purificação de inibidores de tripsina e,  $\alpha$ -amilases em *Helicoverpa armigera* (GADJE et al., 2015); efeito da precipitação com acetona sobre a preparação de oligômeros de quitina (KAZAMIA, 2015); purificação parcial de inibidor de tripsina em sementes de *Adenantha pavonina* (DE SOUZA et al., 2016) e, o efeito precipitante da acetona sobre a purificação de inibidor de tripsina a partir de *Albizia amara* (DABHADE MOKASHE e PATIL, 2016).

O emprego de acetona em metodologias experimentais destinadas à purificação de proteínas assume uma versatilidade ainda maior, quando comparada com o álcool etílico, pois além da sua utilização como agente precipitante, constata-se também o seu emprego como solvente desengordurante, bem como extrator de metabólitos de menor solubilidade. Esse tipo de aplicação é muito comumente empregada na purificação de proteínas oriundas de extratos vegetais, assim como de amostras advindas de tecidos com placas de tecido adiposo justaposto a eles, como exemplo, destaca-se o uso de acetona na extração de partículas lipídicas, do extrato preparado a partir das vísceras do *Salaria basilisca* (KTARI et al., 2012); despigmentação do extrato preparado com as sementes de *Helicoverpa armigera* (GADJE et al., 2015); uso de acetona a frio, como agente desengordurante do

extrato enzimático preparado com as vísceras do *Barbus callensis* (NASRI et al., 2012).

Neste tipo de técnica, a forma com que as proteínas são fracionadas está diretamente relacionada ao enovelamento tridimensional e, de quais aminoácidos ocupam a face externa da estrutura globular. Entretanto, em se tratando de extratos de origem vegetal, tem-se que a quantidade de metabólitos secundários pode interferir drasticamente na atividade final desempenhada pela proteína, de forma que a ação do solvente orgânico poderá induzir uma maior incorporação destes metabólitos junto à macromolécula, resultando no fim do processo, a sua inativação.

### 2.6.3 Precipitação de proteína por sistema trifásico (TPP)

Além das técnicas apresentadas nas seções anteriores, destacamos também, por meio deste trabalho, a implementação do fracionamento de proteínas por sistema trifásico (TPP), uma técnica realizada com a adequação de diferentes sais e álcoois de baixa solubilidade. Trata-se de uma metodologia que engloba diferentes métodos de precipitação, como a salting out, precipitação isoiónica, precipitação osmolítica e cosmotrópica de proteínas (KTARI et al., 2012)

Na literatura são muitos os trabalhos destinados à purificação de proteínas por meio de partição em sistema TPP, como  $\beta$ -galactosidade de *Lactobacillus acidophilus* (CHOONIA e LELE, 2013); Ficina do Figo Mediterrâneo (*Ficus carica* L.) (GAGAOUA et al., 2014) e na purificação de Nattokinase (GARG e THORAT, 2014). A maioria deles realizam análises comparativas entre diferentes sais, em suas variadas concentrações e, diferentes solventes orgânicos, os quais tendem a mostrar resultados bastante adversos, sejam na capacidade de purificar a proteína de estudo, ou na otimização de uma melhor taxa de recuperação.

Assim como discutido para os métodos anteriores, em que a forma com que as proteínas foram eluídas dependiam de suas propriedades estruturais, o mesmo fenômeno é atribuído a esta técnica (TPP), sendo que aqui, o *t*-butanol liga-se às proteínas precipitadas (interface), aumentando assim a sua flutuabilidade e, fazendo com que os precipitados se mantenham acima da camada salina (aquosa) mais densa. Por outro lado, os pigmentos, lipídeos e, materiais hidrofóbicos; estarão concentrados na fase superior, ao passo que os componentes polares como proteínas remanescentes, sacarídeos e eletrólitos, se concentrarão na fase aquosa (inferior) (SEN et al., 2011).

### 3. OBJETIVOS

#### 3.1 Objetivo Geral

Purificar e caracterizar serino protease e inibidor de tripsina de interesse biotecnológico e, avaliar possíveis aplicações como novo coagulante de leite e ação inseticida.

#### 3.2 Objetivos Específicos

##### 3.2.1 Espécie *C. stipularia*

- ✓ Identificação taxonomia da espécie;
- ✓ Determinar atividade proteolítica no extrato bruto;
- ✓ Avaliar o efeito da maturação das sementes na atividade proteolítica e lipolítica;
- ✓ Avaliar aplicação biotecnológica do extrato bruto para coagulação de leite bovino desnatado e integral;
- ✓ Determinar melhor proposta de precipitação de proteínas;
- ✓ Purificar e caracterizar serino protease das sementes verdes de *C. stipularia*;
- ✓ Realizar análises de parâmetros cinéticos, e verificar sua especificidade para diferentes substratos conjugados com *p*-nitroanilina.

##### 3.2.2 Espécie *C. plumieri*

- ✓ Identificação taxonomia da espécie;
- ✓ Determinação de atividade inibitória para tripsina comercial bovina;
- ✓ Purificar inibidor de tripsina por meio de métodos cromatográficos;
- ✓ Avaliar a especificidade do inibidor de tripsina para diferentes serino proteases;
- ✓ Avaliar potencial inseticida da molécula mediante inibição da serino protease isolada do intestino do inseto praga *T. castaneum*.
- ✓ Determinar constantes cinéticas para a proteína isolada.

## 4. METODOLOGIA

### 4.1 Identificação das Espécies *C. stipularia*, *C. plumieri* e Preparo do Extrato Bruto

Após a extração das sementes necessárias para a obtenção do extrato bruto, coletou-se uma amostra das espécies vegetais para identificação e deposição dos exemplares no repositório do Herbário MAC do Instituto de Meio Ambiente-IMA/AL (Nº 64102 e 65056 respectivamente) (Figura 13).

As plantas selecionadas apresentavam em suas estruturas todos os requisitos necessários para a devida identificação (folhas, flores, caules e vagens). O preparo das exsicatas foi realizado sob orientação e coordenação dos funcionários do IMA responsáveis pela identificação.

Figura 13: Espécies de estudo: *C. stipularia* (A); *C. plumieri* (B)



Fonte: elaborada pelo autor, 2020

Para o preparo do EB da espécie *C. stipularia* foram retiradas as sementes em diferentes estágios de maturação, as quais foram pesadas em balança analítica (Marte AY220) (0,789 g). Por outro lado, com a espécie *C. plumieri* obteve-se o EB apenas com as sementes secas (10,1g). Após coleta e separação dos materiais, as amostras foram trituradas em tampão de extração (Tris-HCl, 50 mM pH8,0) na razão de 1:30 (g/mL). Para esse procedimento foi tomado como instrumento auxiliar um homogeneizador de tecidos (HOMOMIX, Ser. No.: 175315) durante 5 min em alta

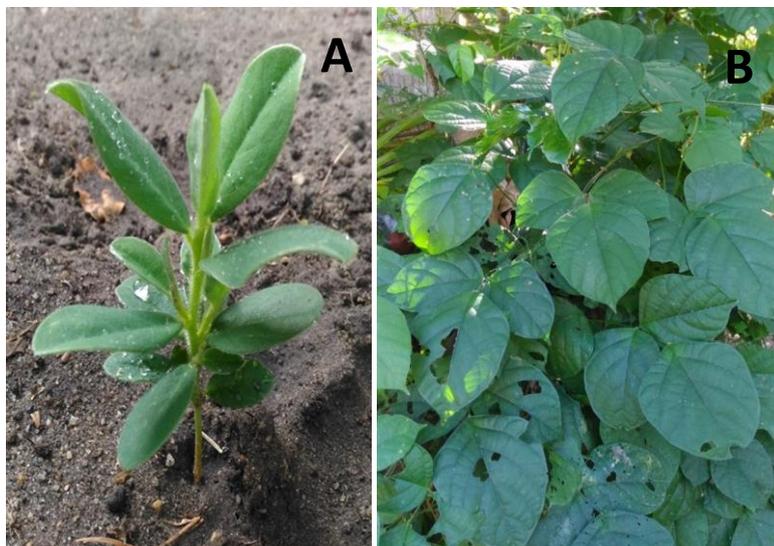
rotação a 0 °C, para possibilitar uma maior integridade estrutural das proteínas extraídas das sementes.

Em seguida, as soluções foram mantidas sob agitação constante por 180min, para maior efetividade na extração das moléculas. Ao término do procedimento, foi observado a presença de material particulado de granulometria heterogênea para ambas as espécies vegetais, necessitando com isso, de uma centrifugação auxiliar, para que as partículas insolúveis fossem precipitadas e; o sobrenadante, empregado nas demais análises experimentais.

#### 4.2 Cultivo das Espécies *C. stipularia* e *C. plumieri*

Durante a execução do trabalho, tomou-se a precaução de manter um repositório das espécies através de plantio em pequena escala de *C. stipularia* e *C. plumierii*, garantindo desta forma, a continuidade da pesquisa, visto que a localidade inicial onde foram encontradas não apresentava cuidados devidos para a manutenção das espécies na região. (Figura 14).

Figura 14: Cultivo das espécies *C stipularia* (A) e *C. plumieri* (B)



Fonte: elaborada pelo autor, 2020

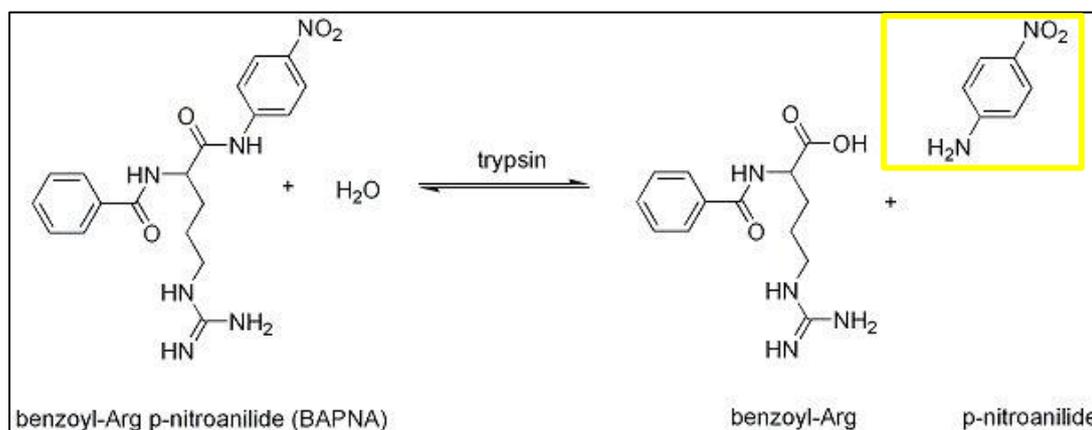
Cientes de que as proteínas expressas por determinados organismos são intimamente influenciadas por fatores externos, tomou-se o cuidado de que a escolha da região para fundamentação do plantio estivesse numa localidade geograficamente similar à de origem (cidade de Marechal Deodoro/AL). Além do mais, as plantas cultivadas foram mantidas sob as mesmas condições dos exemplares silvestres (ausência de fertilizantes e, demais produtos relacionados).

### 4.3 Ensaio Enzimático

#### 4.3.1 Efeito da concentração do extrato bruto da espécie *C. stipularia* na hidrólise do substrato BAPNA (N-a-benzoyl-L-arginine-p-nitroanilide)

Como forma de confirmação da presença de enzimas proteolíticas no extrato bruto (EB) obtido a partir das sementes da planta *C. stipularia*, realizou-se um ensaio enzimático com o substrato BAPNA, preparado em DMSO à concentração de 50mM. Nessa reação, um dos produtos da hidrólise é o *p*-nitroalnilina, cuja coloração amarela é monitorada a 410 nm (Figura 15).

Figura 15: Hidrólise do N-a-benzoyl-L-arginine-p-nitroanilide (BAPNA)



Fonte: <https://pediia.com/difference-between-trypsin-and-chymotrypsin/>. Acesso em 06 de junho de 2020

Em virtude de a amostra aparentar elevada complexidade molecular (proteínas, gorduras e metabólitos secundários) decidiu-se avaliar a concentração da solução enzimática em função do volume de extrato usado na reação, pois análises destinadas a quantificação de proteína se mostram pouco efetiva, mediante a elevada possibilidade de interferentes (pigmentos, por exemplo) que podem suprimir o real valor da quantidade de matéria existente da enzima estudada (ZAIA et al., 1998).

Na Tabela 3, mostra-se detalhadamente os diferentes volumes do extrato utilizado na reação, bem como as proporções ajustadas para as demais soluções. A reação foi realizada a 37°C e o tempo de incubação foi estimado em 60min. Para interrupção do ensaio, utilizou-se a adição de 500µL de ácido cítrico (20%), e avaliado a produção de *p*-nitroanilina a 410 nm.

**Tabela 3:** Hidrólise de BApNA em função da concentração do EB de *C. stipularia*

<b>Extrato Bruto (µL)</b>	10	20	30	40	50
<b>Solução reveladora (µL)</b>	100	100	100	100	100
<b>Tampão (µL)</b>	390	380	370	360	350
<b>Ácido cítrico (µL)</b>	500	500	500	500	500

Fonte: elaborada pelo autor, 2020

#### 4.3.2 Efeito do período de incubação na atividade proteolítica do EB da espécie *C. stipularia*

Além do monitoramento da atividade enzimática em função da concentração do extrato obtido a partir das sementes de *C. stipularia*, realizou-se o monitoramento da hidrólise do substrato BApNA em diferentes intervalos de tempo (10, 20,30,40,50 e 60min). Neste procedimento, tomou-se 50µL do extrato, seguindo as mesmas proporções do ensaio enzimático discorrido no item anterior, assim como toda metodologia experimental supracitada.

#### 4.3.3 Efeito da temperatura na atividade proteolítica do EB da espécie *C. stipularia*

Com a finalidade de avaliar o efeito da temperatura na estabilidade da enzima, foi verificado o efeito do aumento drástico na temperatura sobre a taxa de conversão do substrato BApNA em *p*-nitroanilna e, desta forma, certificar-se que a hidrólise do substrato cromogênico era proporcionada pela ação catalítica da macromolécula e, não de metabólitos secundários. Para isso, o extrato bruto foi previamente aquecido a 100°C por 5 min e, em seguida, incubado a 37°C (60 min) na presença do substrato BApNA (2 µL).

#### 4.3.4 Efeito da maturação das sementes da espécie *C. stipularia* na atividade proteolítica

Como forma de avaliar o efeito da maturação das sementes sobre a taxa de hidrólise do substrato BApNA, realizou-se um procedimento experimental de forma a comparar as sementes de *C. stipularia* em diferentes estágios de maturação, as quais foram esquematicamente identificadas como sementes verdes (SV) e sementes secas (SS). Para tanto, foi necessário a obtenção de novos extratos, com as sementes previamente selecionadas. (Figura 16).

Figura 16: *C. stipularia*: sementes verdes (A); sementes secas



Fonte: elaborada pelo autor, 2020

O primeiro extrato preparado (SV) foi obtido a partir de 20 vagens em estágio inicial de maturação (sementes verdes) (2,6118 g). A preparação foi realizada com o uso de tesoura e almofariz. Em seguida, submetida a agitação em tampão tris-HCl 50mM pH 8,0 (20mL) por 8 h. As partículas insolúveis foram retiradas através de centrifugação, e o sobrenadante final foi usado nas análises experimentais.

O segundo extrato (SS) foi obtido a partir de sementes secas (33 vagens) 6,4303 g e, para garantir uma concentração equimolar, os procedimentos foram realizados com os mesmos parâmetros. A razão massa-volume de sementes e tampão mantiveram-se constantes. Para análise enzimática, efetuou-se reações com ambos os extratos utilizando como parâmetro cinético a hidrólise do BApNA, conforme esquematizado no item 4.3.1.

Ainda neste protocolo, foi avaliado a atividade lipolítica no EB de *C. stipularia* com as sementes em diferentes estados de maturação, tendo em vista a análise da participação das hidrolases no processo de senescência da planta. Atividade lipolítica foi determinada mediante a hidrólise do substrato *p*-nitrofenilpalmitato. Os extratos brutos das sementes verdes e secas foram preparados na mesma razão (m/v), e em seguida submetidos ao ensaio enzimático com o substrato *p*-nitrofenilpalmitato. As reações foram processadas a 37 °C por 30 min. Todas as análises foram efetuadas em triplicata, e para interrupção da reação, foram adicionados 500µL de ácido cítrico 20% (v/v).

#### 4.3.5 Ensaio inibitório do EB da espécie *C. plumieri* frente a tripsina bovina comercial

Ao fim do processo de extração das proteínas a partir das sementes de *C. plumieri*, percebeu-se que o material obtido mostrou coloração bastante intensa, característico de amostras ricas em metabólitos secundários. Sendo assim, decidimos não avaliar, de imediato, a quantificação de proteínas (mg/mL) uma vez que a coloração característica do extrato dificultaria a análise, pela presença dos metabólitos referidos acima (ZAIA, 1998).

É importante destacar que trabalhos destinados a purificação e, caracterização de proteínas, devem ser realizados mediante rigoroso controle termodinâmico do sistema, seja pelo controle da temperatura, ou mesmo pelo pH em que o extrato é mantido. Assim, tomou-se a precaução de toda a manipulação da amostra ser realizada sob refrigeração, a 4°C, conferindo à estrutura das proteínas solúveis, maior estabilidade tridimensional dos aminoácidos.

A execução da análise inibitória foi realizada com a enzima tripsina bovina, mediante hidrólise do substrato BApNA, consoante ao trabalho publicado por Erlanger, Kokowski e Cohen (1961). O substrato foi preparado a uma concentração inicial de 50mM, solubilizado em DMSO. Para o experimento foram tomados 10µL do extrato de *C. plumieri*, 10µL da solução enzimática (1mg/mL de tripsina) e 130µL de tampão de extração (Tris-HCl 50mM pH 8,0). A solução enzimática foi preparada com tripsina bovina, na concentração de 1mg/mL. Como solvente, foi tomado o tampão Tris-HCl, 50mM pH 8,0.

Após a adição, a mistura foi mantida em incubação por 15min a temperatura ambiente, na finalidade de favorecer a associação intermolecular entre a tripsina e, o inibidor enzimático alocado no extrato vegetal. Em seguida, foram adicionados a mistura, 100µL de solução reveladora (2µL de BApNA + 98µL de tampão Tris-HCl 50 mM pH 8,0). Posteriormente, seguido de agitação mecânica. As amostras foram mantidas em banho maria, por 30 min a 37 °C.

Como se trata de um mecanismo inibitório, é muito importante que exista uma reação controle, para que a partir dela, possamos verificar o impacto inibitório promovido pela suposta molécula de estudo. Assim, foi realizado uma reação hidrolítica para a enzima tripsina sem a presença do inibidor, em que foram tomados 10µL da solução enzimática (1mg/mL) e 140µL de tampão de extração. Posteriormente, a amostra foi mantida a temperatura ambiente por 15min e, em

seguida, adicionado solução reveladora 100µL (2µL de BApNA + 98µL de tampão Tris-HCl 50mM pH 8,0). A reação foi processada à 37 °C e, após 30 min, com a visualização da cor característica da hidrólise do BApNA, interrompemos a reação, com a adição de 100 µL de ácido cítrico 20% (v/v).

#### 4.3.6 Efeito da concentração do EB de *C. plumieri* na atividade inibitória

Na finalidade de monitorar a especificidade do inibidor frente a tripsina bovina, efetuou-se um protocolo experimental para diferentes concentrações do inibidor e, assim, verificado a efetividade em inativar a enzima. Seguindo os princípios relatados no trabalho realizado com as sementes de *C. stipularia*, tomou-se, para essa metodologia, a variação do volume de extrato bruto, já que a quantificação de proteínas (mg/mL) não representava um resultado estatisticamente preciso.

Na Tabela 4, vemos detalhadamente os diferentes volumes do extrato utilizados na reação, bem como as proporções ajustadas para as demais soluções. Frisa-se também que, semelhantemente aos ensaios enzimáticos realizados para espécie *C. stipularia*, a solução reveladora foi preparada a partir de 2µL de BApNA.

**Tabela 4:** Hidrólise de BApNA em função da concentração do extrato bruto

<b>Extrato Bruto (µL)</b>	10	5,0	1,5
<b>Tampão (µL)</b>	130	135	138,5
<b>Tripsina bovina (µL)</b>	10	10	10

Fonte: elaborada pelo autor, 2020

Após a adição, a mistura foi agitada de maneira mecânica e, incubada a temperatura ambiente por 15min. Em seguida, a solução foi incrementada com a adição de 100µL de solução reveladora. A reação foi processada à 37 °C, e após 30min, com a visualização da cor característica da hidrólise do BApNA, interrompemos a reação, com a adição de 100µL de ácido cítrico 20% (v/v).

É importante destacar que nesse experimento foi preparado um controle de reação para cada volume de extrato e, que em virtude da intensa coloração do material, foram tomados brancos distintos.

#### 4.3.7 Efeito da temperatura na atividade inibitória do EB da espécie *C. plumieri*

Inibidores de origem polipeptídica, podem assim como os demais polímeros de aminoácidos sofrer alterações de suas estruturas terciárias, mediante a ação de fatores como força salina, ação de solventes orgânicos, variação do pH, e principalmente, através da mudança da temperatura. Assim, foi verificado o efeito do aumento drástico na temperatura sobre a estrutura tridimensional do inibidor, mediante ensaio com a enzima tripsina bovina, na conversão do substrato BApNA em *p*-nitroanilina. Os parâmetros reacionais foram os mesmos utilizados na Seção 4.3.5, sendo que neste, o extrato foi induzido a aquecimento (100°C) por 5min. Para o experimento tomou-se 10µL do extrato de *C. plumieri*, 10µL da solução enzimática (1mg/mL de tripsina) e 130µL de tampão de extração (Tris-HCl 50mM pH 8,0).

Após a adição, a mistura foi mantida em incubação por 15min à temperatura ambiente, em seguida, foram adicionados 100µL de solução reveladora (2µL de BApNA + 98µL de tampão Tris-HCl 50 mM pH8,0). Posteriormente, seguido de agitação mecânica. As amostras foram mantidas em banho maria, por 30 min. Semelhantemente ao verificado no experimento anterior, fora preparado uma reação controle, para que a partir dela, pudéssemos verificar o impacto inibitório promovido pela suporta molécula de estudo.

#### 4.3.8 Ação inibitória do EB da espécie *C. plumieri* avaliada por zimografia reversa

A visualização do perfil de inibição *in-gel* do extrato bruto foi realizada de acordo com adaptações ao método de Prasad et al., (2010). Inicialmente, a eletroforese foi processada com a aplicação de concentrações crescentes do extrato das sementes de *C. plumieri* (aplicando-se um volume máximo de 20µL em cada canaleta) e, o gel, previamente polimerizado com caseína (0,1%). Após a corrida eletroforética, o gel foi incubado em solução Triton X-100 a 2,5% (v / v) em Tris-HCl por 20min a 37 ° C, para a retirada de SDS polimerizado no gel e, em seguida, lavado com água destilada.

Posteriormente, o gel foi incubado com solução de tripsina (1,5 mg/mL) em tampão de extração por 28h a 37°C. Ao fim, o gel foi mergulhado em 0.2% Comassie Brilliant Blue G-250 em H<sub>2</sub>O: Metanol (1:1) e posteriormente lavado com solução descorante (50% metanol e 10% ácido acético).

#### 4.3.9 Ensaio inibitório do EB da espécie *C. plumieri* em fase sólida

A visualização do perfil de inibição *in-gel* do inibidor orgânico foi realizada de acordo com adaptações ao método de Dias et al., (2017). Para tanto, foram tomadas alíquotas da solução de tripsina bovina incubada com inibidores comerciais (SBTI e Benzamidina) e com diferentes concentrações do extrato de *C. plumieri*. As misturas foram mantidas em incubação por 15 min e, em seguida, induzida a eletroforese nativa.

O gel foi previamente polimerizado com caseína (0,1%), e após a corrida eletroforética, lavado em solução Triton X-100 a 2,5% (v / v) em Tris-HCl por 20min a 37 °C. Após a lavagem, os géis foram mantidos em tampão de extração por 28h, a 37°C, para que a tripsina aplicada nas canaletas realizasse a hidrólise da caseína polimerizada no suporte sólido. A coloração foi efetuada com uma solução contendo 0,1% (m / v) de Coomassie Brilliant Blue R-250 em metanol, ácido acético e água (4: 1: 5, v / v / v) por 4 h. O excesso de corante foi removido do gel usando uma solução de metanol, ácido acético e água (4: 1: 5, v/v/v).

### 4.4 Estratégias de Purificação de Proteínas

#### 4.4.1 Precipitação de proteínas com sulfato de amônio $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$

Após a certificação da presença de serino proteases no extrato enzimático obtido a partir das sementes de *C. stipularia* e, determinado a influência da maturação das sementes na atividade tripsínica, realizou-se o processo de purificação da molécula estudada, iniciado pela precipitação salina com sulfato de amônio, como forma de eliminar demais proteínas contaminantes e, concentrar a atividade enzimática numa amostra de maior resolução. O material usado para essa análise foi obtido da desconstrução das sementes (SV), conforme mostrado no item 4.3.4.

Os mesmos protocolos experimentais descritos nessa seção foram aplicados com o EB obtido a partir das sementes de *C. plumieri*, e toda a operação realizada a baixa temperatura (4°C) no intuito de preservar a integridade estrutural das macromoléculas.

Os fracionamentos impostos são mostrados na Tabela 5 e ambas as etapas de precipitação foram realizadas a 15,000xg 4°C por 20min, com centrífuga

refrigerada (HERMLE- Z236K). O volume inicial de extrato utilizado para a precipitação foi de 10mL.

Tabela 5: precipitação Salina: relação em massa da proporção de sulfato de amônio aplicado no experimento

Fração (%)	Massa de (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> (g)
0-20	1,060
20-40	1,164
40-60	1,260
60-80	1,419
80-100	-

Fonte: elaborada pelo autor, 2020

#### 4.4.2 Precipitação de proteínas com solventes orgânicos (acetona e etanol)

Além da precipitação com sulfato de amônio, realizou-se também, com ambas as espécies (*C. stipularia* e *C. plumieri*), um método comparativo de precipitação de proteínas com diferentes solventes orgânicos (acetona e etanol). Após a homogeneização de cada uma das proporções dos solventes, 0-80% (v/v), os materiais foram mantidos na geladeira por 15min (4°C) e, posteriormente, centrifugado a 1500xg 4°C por 15min. Os precipitados obtidos foram ressuspensos em tampão Tris-HCl 50mM pH8,0, para posterior ensaio enzimático.

#### 4.4.3 Precipitação de proteínas por sistema trifásico- TPP

Como forma de otimização do método cromatográfico e, possibilitar a purificação da enzima encontrada no extrato da espécie *C. stipularia* em níveis mais satisfatórios de recuperação, foi realizado um sistema de precipitação trifásico (TPP), usando como fase orgânica o álcool *t*-butílico e, sal precipitante o sulfato de amônio.

Inicialmente foram tomados 5mL de EB de *C. stipularia*, em que foram submetidos a precipitação com sulfato de amônio até a concentração 60% (m/v). A adição do sal seguiu os mesmos protocolos referidos no item 4.4.1, sendo que, antes de realizar a centrifugação, foi adicionado álcool *t*-butílico na razão de 1/0.5 (v/v) e mantido em descanso por 60min, a temperatura ambiente. Durante a adição do álcool, tomou-se o cuidado de efetuar uma agitação moderada, através de movimentos circulares com o tubo falcon utilizado (15mL).

Decorrido o tempo estipulado, a amostra foi centrifugada a 5000xg 15 min e 4°C. Posteriormente, as três fases formadas foram separadas e destinadas a ensaio enzimático com o substrato BApNA.

#### 4.4.4 Purificação de proteínas por métodos cromatográficos

As frações de *C. stipularia* com maiores atividades proteolíticas provenientes das precipitações salina e sistema trifásico-TPP, foram submetidas à cromatografia líquida em gel filtração, com a coluna cromatográfica S-100 Sephacril (50mL), acoplada ao FPLC Akta M1. As cromatografias foram realizadas sob os seguintes parâmetros: coluna equilibrada com tampão Tris-HCl 50mM pH 8,0 + 0,5M de NaCl, fluxo de 0,1mL/min, 300µL de amostra aplicada diretamente à coluna, 2mL de solução coletada em cada fração cromatográfica e monitoramento em tempo real das proteínas eluídas através de espectrofotômetro acoplado ao Akta a 280nm.

Ao término desse processo cromatográfico, foi tomado o material de *C. stipularia* com maior atividade enzimática obtida a partir do fracionamento com acetona. A amostra foi reunida e aplicada em uma coluna cromatográfica DEAE-Sepharose (30mL), trocadora de ânions, onde o tampão de equilíbrio foi 50mM Tris-HCl pH 8,0 (A) e, para eluição, 50mM Tris-HCl pH 8,0 + 0,5M de NaCl (B), aplicando um gradiente de 0-100% do mesmo, a um fluxo de 0,5mL/min em 40 volumes de coluna.

Para o monitoramento enzimático (atividade hidrolítica do substrato BApNA) das frações coletadas, foram usados 350µL de tampão, 100µL de solução reveladora (2µL de BApNA + 98µL de tampão Tris-HCl 50mM pH 8,0) e 50µL das frações coletadas. A reação foi processada à 37 °C, e após 30 min, adicionou-se 500µL de ácido cítrico 20 % (m/v), para bloqueio da reação. Em seguida aferiu-se a absorbância a 410nm no espectrofotômetro de cada reação.

Além das experimentações cromatográficas utilizando a planta *C. stipularia*, após certificação da ineficiência no processo de fracionamento proteico para o EB obtido a partir das sementes de *C. plumieri*, destinou-se este material à metodologia cromatográfica por troca iônica, seguindo os mesmos parâmetros experimentais usados com a espécie *C. stipularia*. Para o monitoramento inibitório das frações coletadas foram usados 60µL de tampão, 40µL de solução reveladora (1µL de BApNA) e 100µL das frações coletadas. A reação foi processada à 37 °C, e após

30 min, adicionou-se 100µL de ácido cítrico 20 % (m/v), para bloqueio da reação. Em seguida aferiu-se a absorbância a 410nm em microplaca.

#### **4.5 Eletroforese SDS-PAGE**

Ambas as eletroforeses provenientes das amostras de *C stipularia* e *C. plumieri* foram realizadas à voltagem constante, em gel de poliacrilamida com dodecil-sulfato de sódio (SDS-PAGE) 12 e 15%, usando 5% e 15% (m/v) para os géis de empilhamento e separação respectivamente (LAEMMLI, 1970). Ao fim, o gel foi mergulhado em 0.2% Coomassie Brilliant Blue G-250 em H<sub>2</sub>O: Metanol (1:1), e posteriormente lavado com solução descorante (50% metanol e 10% ácido acético).

#### **4.6 Determinação da Concentração de Proteína (*C. stipularia* e *C. plumieri*)**

As concentrações proteicas foram determinadas pelo método de Bradford (1976), usando albumina de soro bovino como padrão (250-0,009µg/mL). Para isso foram tomados 10µL das amostras, adicionados 190µL de reagente de Bradford. Posteriormente as amostras foram incubadas por 5min, e medido a absorbância a 595nm. As unidades correspondentes são (mg/mL) de proteína.

#### **4.7 Determinação de Parâmetros Cinéticos**

4.7.1 Estabilidade e determinação da atividade ótima em diferentes pHs para a protease isolada das sementes verdes de *C. stipularia*

Para a determinação do pH ótimo, foi avaliado o tamponamento com maior taxa de hidrólise do substrato BApNA, os sistemas tampão escolhidos foram: acetato de sódio (pH 4-6); fosfato de sódio (pH 7,0); Tris-HCl (pH 8,0); glicina (pH 9-11) todos à concentração de 100mM. Para determinação do pH ótimo as enzimas foram mantidas a 37°C nos diferentes pHs por 60min e, posteriormente determinado a taxa da hidrólise, usando o BApNA como substrato, com monitoramento a 410 nm. Em se tratando dos testes de estabilidade, a proteína isolada foi incubada por 60min nos diferentes pHs. Após o tempo especificado, todas as frações foram submetidas à reação com o BApNA em condições ótimas (50°C e pH 8,0) e posteriormente, avaliado por meio da intensidade da leitura (410nm) a estabilidade dependente da variação de pH.

#### 4.7.2 Estabilidade e determinação da temperatura ótima da protease isolada das sementes verdes de *C. stipularia*

As enzimas isoladas tiveram suas atividades avaliadas em diferentes temperaturas (20, 30, 40, 50, 60 e 70°C), para especificar a temperatura ótima. A determinação da temperatura ótima foi realizada através da incubação das enzimas por 60min nas diferentes temperaturas, e posteriormente, avaliado a taxa de hidrólise do substrato BApNA. Para os testes de estabilidade, a proteína isolada foi incubada por 60min nas diferentes temperaturas, e posteriormente, submetida à hidrólise com o substrato por mais 60min (50°C), e assim, avaliado a liberação de *p*-nitroanilina num espectrofotômetro a 410nm.

#### 4.7.3 Especificidade da enzima purificada de *C. stipularia* perante substratos sintéticos conjugados com *p*-nitroanilina (*p*-NA)

Substratos peptídicos sintéticos conjugados com *p*-nitroanilida foram utilizados para verificar a especificidade da serino protease purificada a partir das sementes de *C. stipularia*. Os substratos escolhidos foram L-Leu-*p*NA, Na-Benzoil-DL-Arg-*p*NA (DL-BApNA) e N-Suc-LPhe-*p*NA. Para ambos os substratos, as soluções estoques foram preparadas em DMSO na concentração de 50mM. Durante a reação, foram adicionadas proporções dos substratos equivalentes a uma concentração final de 0,25mM, em que foram mantidas a 37°C por 60min.

Após o tempo estabelecido, adicionou-se ácido cítrico (20%), na proporção de 1/1. Em seguida, a intensidade da cor amarela resultante foi determinada medindo a absorbância contra a amostra em branco a 410nm.

#### 4.7.4 Determinação de constantes cinéticas para a protease isolada de *C. stipularia*

Os estudos cinéticos da enzima purificada foram efetuados durante 60 min a 50°C em diferentes concentrações do substrato BApNA (0,01 a 0,6 mM). As determinações foram tomadas de acordo com os parâmetros cinéticos, incluindo  $K_m$  e  $V_{max}$ . O  $k_{cat}$  foi calculado pela seguinte equação:  $k_{cat} = V_{max}/[E]$ , onde  $[E]$  é a concentração de enzima total e  $V_{max}$  a sua velocidade máxima.

#### 4.7.5 Especificidade do inibidor de tripsina isolado das sementes de *C. plumieri* frente a diferentes enzimas proteolíticas

Na finalidade de averiguarmos a especificidade inibitória da proteína isolada, realizamos um ensaio enzimático com o fármaco pancreatina, constituído de múltiplas enzimas digestivas. Para isso, foram utilizados diferentes substratos sintéticos, específicos às enzimas a serem estudadas. Os substratos escolhidos foram L-Leu-pNA, Na-Benzoil-DL-Arg-pNA (DL-BApNA) e N-Suc-LPhe-pNA. Para ambos os substratos, as soluções estoques foram preparadas em DMSO, conforme esquematizado no tópico 4.7.3.

#### 4.7.6 Determinação das constantes cinéticas do inibidor isolado da espécie *C. plumieri* (IC50 e Ki)

O valor de IC50 do inibidor de tripsina isolado das sementes de *C. plumieri* foi determinado por análises de regressão linear (GraphPad Prism Software), das curvas de inibição realizadas em triplicata, para a tripsina bovina comercial. Tal valor, indica a concentração do inibidor necessário para reduzir a atividade da enzima em 50%. Por outro lado, a constante de inibição Ki foi derivada a partir dos cálculos de IC50, usando as equações de Cheng e Prusoff (CHENG, 2002; PEREIRA, SALGADO e Oliveira, 2009).

### 4.8 Aplicações Biotecnológicas

#### 4.8.1 Teste de coagulação do EB de *C. stipularia* com leite desnatado.

A verificação da atividade coagulante utilizando a solução do extrato enzimático de *C. stipularia*, foi analisada por meio do tempo necessário para coagular uma solução reconstituída de leite bovino em pó desnatado e, como controles de reação, foram tomadas alíquotas equivalentes do TE. Essa metodologia foi adaptada de Arima et al., (1970) realizado com o leite em pó desnatado, incorporado em 10% em uma solução de água destilada, contendo 10 mM de cloreto de cálcio (CaCl<sub>2</sub>). A solução foi armazenada sob refrigeração (4 °C) e seu pH ajustado para 6,5.

Para o teste de coagulação foram tomadas alíquotas da preparação do leite (1,0mL) distribuídas por triplicatas em tubos eppendorfs, os quais foram mantidos em banho maria por um período de 10 min a 37 °C. Posteriormente adicionou-se a

solução enzimática (200µL de EB) onde foi monitorado o exato instante em que ocorria toda a coagulação do leite. O cálculo da unidade de atividade foi mensurado a partir da quantidade de enzima capaz de coagular 10 mL do substrato em 40 min (2400 s) a 37 °C, conforme equação MCA (U/mL) =  $[(2400 \times V)/t] \times v$ . Em que “V” é o volume do leite (mL); “t” o tempo de coagulação em segundos e “v” o volume de extrato enzimático aplicado (mL) (GAGAOUA et al., 2017).

#### 4.8.2 Efeito da temperatura no processo de coagulação do leite

Com a pretensão de verificarmos a influência térmica na atividade coagulante do EB de *C. stipularia*, realizou-se um ensaio de coagulação em diferentes temperaturas. Para tanto, foram tomadas alíquotas da preparação do substrato (1,0 mL) distribuídas por triplicatas em tubos eppendorfs, os quais foram mantidos em banho maria por um período de 10 min a 37 e 50 °C. Posteriormente adicionou-se a solução enzimática (200µL de EB) onde foi determinada a temperatura ótima de reação pelo menor tempo necessário para a obtenção do coágulo.

Conforme mostrado anteriormente, as enzimas de origem polipeptídica podem sofrer alterações de suas estruturas terciárias mediante a ação de alguns fatores, dos quais destacamos a mudança brusca na temperatura. Frente a isto, como forma de avaliar a estabilidade térmica e, vincular à capacidade coagulante a participação direta de mecanismos enzimáticos, decidi submeter o EB a uma prévia desnaturação, através de aquecimento do material por 15 min a 100 °C. Como controle positivo, utilizou-se o EB não aquecido e, desta feita, comparado a atividade coagulante de forma separada. A reação se processou até que fosse possível visualizar a formação do coágulo.

#### 4.8.3 Verificação da hidrólise de caseína do leite desnatado por eletroforese e dosagem de proteínas solúveis

Após confirmação da atividade coagulante do EB de *C. stipularia*, o produto de hidrólise foi centrifugado, para maior separação dos constituintes (soro e coágulo). Posteriormente, por meio de eletroforese, foi avaliado a redução de caseína solúvel, após ação das proteases séricas presentes no extrato. Para esta análise foi utilizado uma eletroforese operada à voltagem constante, em gel de poliacrilamida com dodecil-sulfato de sódio (SDS-PAGE) 12 e 15%, usando 5% e 15% (m/v) para os géis de empilhamento e separação respectivamente. Ao fim, o

gel foi mergulhado em 0.2% Coomassie Brilliant Blue G-250 em H<sub>2</sub>O: Metanol (1:1), e posteriormente lavado com solução descorante (50% metanol e 10% ácido acético).

Por outro lado, como forma de validarmos os resultados alcançados por eletroforese, foi verificado a concentração de proteínas solúveis residuais e, peptídeos liberados no soro, oriundos da ação proteolítica das enzimas séricas. A concentração proteica foi determinada pelo método de Bradford, usando albumina de soro bovino como padrão (250-0,009µg/mL) (BRAFOR, 1976).

#### 4.8.4 Teste de coagulação do EB de *C. stipularia* com leite integral pasteurizado e influência da diálise na ação coagulante

As mesmas condições do experimento realizado com leite bovino em pó desnatado foram reproduzidas com amostras de leite integral bovino pasteurizado, em que o pH da solução foi ajustado para 6,5 e, adicionado cloreto de cálcio à concentração de 50mM. As amostras foram incubadas em 50°C e a atividade detectada através da visualização do coágulo formado.

Dependendo da hidrólise exercida nas micelas de caseína, assim como a composição química do coagulante utilizado no processamento do leite, os produtos gerados tendem a apresentar características organolépticas diversificadas, ao mesmo tempo que podem elevar ou suprimir a qualidade sensorial destes. Assim, na finalidade de minimizarmos o teor de metabólitos secundários e, automaticamente reduzir o sabor adstringente no EB, submetemos o material a uma prévia diálise em tampão de extração (4 °C) avaliando o efeito da técnica na processabilidade catalítica do EB perante o leite integral bovino pasteurizado.

#### 4.8.5 Teste de inibição, *in vitro*, da proteína isolada das sementes de *C. plumieri* contra tripsina-símilis isolada do intestino do inseto praga *T. castaneum*

Após confirmação do isolamento, bem como determinação da especificidade molecular para diferentes enzimas proteolíticas, decidiu-se avaliar a ação da proteína purificada como possível metodologia de combate aos insetos pragas *T. castaneum*.

Para esta análise, foram realizadas zimogramas com o material bruto (extrato da planta *C. plumieri*) e proteína isolada, bem como avaliou a taxa de inibição da protease do inseto contra dois inibidores de tripsina comerciais (SBI e Benzamidina)

e o inibidor isolado em nosso estudo. A zimografia foi realizada de acordo com as metodologias eletroforéticas supracitadas, sendo que para os controles das reações, foram tomadas alíquotas da protease sérica isolada do intestino do inseto, conforme reportado por Da Silva (2019).

## 5. RESULTADOS

# SEÇÃO I

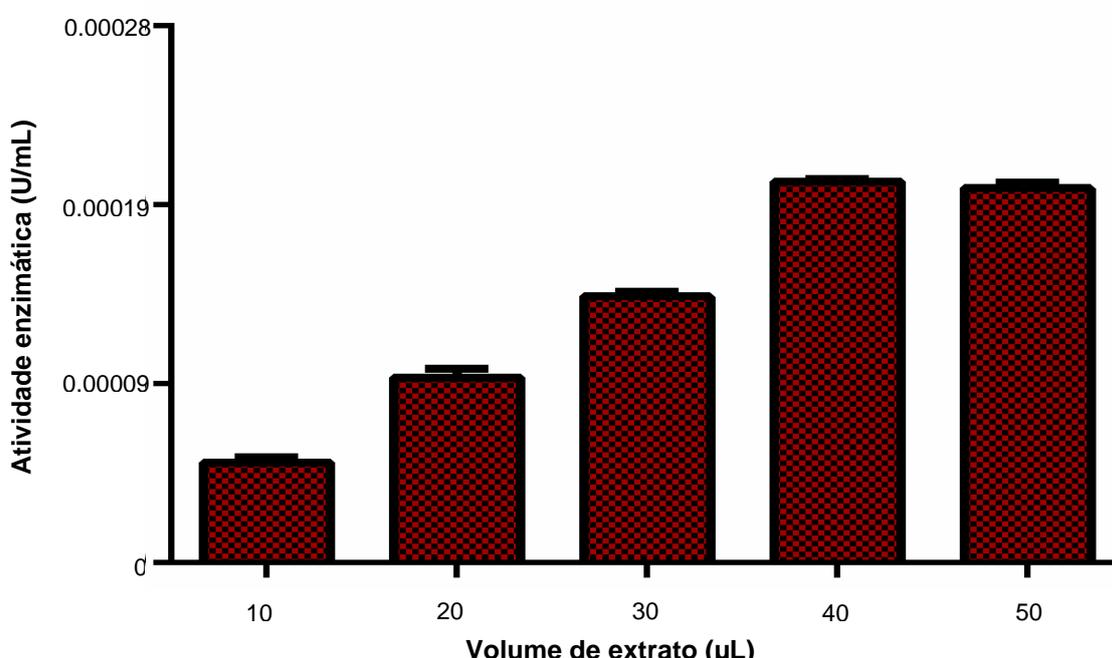
## *(C. stipularia)*

### 5.1 Obtenção das Sementes de *C. stipularia* e Preparo do Extrato Bruto

Com a certificação taxonômica da espécie, realizou-se a extração do material biológico (Sementes) e, após obtenção do EB, efetuou-se um teste enzimático com o substrato BApNA, como forma de detecção da presença de proteases no material coletado. Em virtude de a análise ter sido realizada com um cromóforo sintético específico, foi possível confirmarmos que a classe da protease existente no material é da família das serino proteases, endopeptidases que conservam em seu sítio catalítico a presença dos aminoácidos serina, ácido aspártico e histidina.

A taxa de conversão do substrato em produto, catalisado pela ação enzimática, tem como ponto limitante, a formação do complexo enzima substrato, que é efetivado com a maior interação entre as duas moléculas (CAMPBELL, 2003). Assim, percebe-se que o aumento na concentração da enzima pode desencadear uma maior liberação de *p*-nitroanilina, ao longo do processo reacional. Desta forma, efetuou-se um estudo cinético com diferentes concentrações do extrato e, avaliado a taxa de conversão do BApNA por meio da ação enzimática (Figura 17).

Figura 17: Atividade hidrolítica do extrato de *C. stipularia*, efeito da concentração perante a hidrólise do substrato BApNA



Fonte: elaborada pelo autor, 2020

Como pode-se observar, a produção de *p*-nitroanilina assume uma relação direta com a concentração do extrato vegetal, provavelmente, pela maior concentração de proteases. É muito importante destacar que para esta análise, não

foi levado em consideração a concentração real de proteínas (mg/mL), uma vez que a coloração característica do extrato dificultaria a análise, pela presença de pigmentos, compostos fenólicos e demais estruturas com elétrons  $\pi$  deslocalizados (ZAIA et al., 1998).

São muitos os trabalhos publicados que confirmam a ação de proteases em espécies vegetais, Vallés e Cantera (2018) apontam que de forma natural, as proteases de fontes vegetais desempenham um importante papel na regeneração de moléculas polipeptídicas e, na ativação de estruturas proteicas, através da clivagem na cadeia de aminoácidos em regiões específicas. Van Der Hoorn (2008) e, Schaller et al., (2017) mostraram em estudos independentes que além das funcionalidades mostradas acima, as proteases ainda assumem o papel de defesa contra estresse provocado por ferimentos, frio e seca, bem como reconhecimento e respostas a ações de patógenos e pragas.

Li et al., (2018) ao purificarem uma protease dos frutos de tamarilo afirmaram que em comparação com as literaturas disponíveis, as aspártico proteases são a classe de enzimas mais encontradas em espécies vegetais e, que suas propriedades cinéticas possibilitam a sua utilização em processamento de leites e seus derivados. No entanto, outros estudos também têm confirmado a purificação de outras classes de enzimas, como as cisteíno proteases: (SALVADOR, NOVO e DOMINGOS, 2006); (MNIF et al., 2015); (SZEWINSKA, SIMINSKA e BIELAWSKI, 2016) e serino proteases: (TOMAR e et al., 2008); (SHAH et al., 2014). Cada uma delas, assumindo mecanismo de catálise específico, e tornando-as ativa em uma ampla faixa de pH e temperatura.

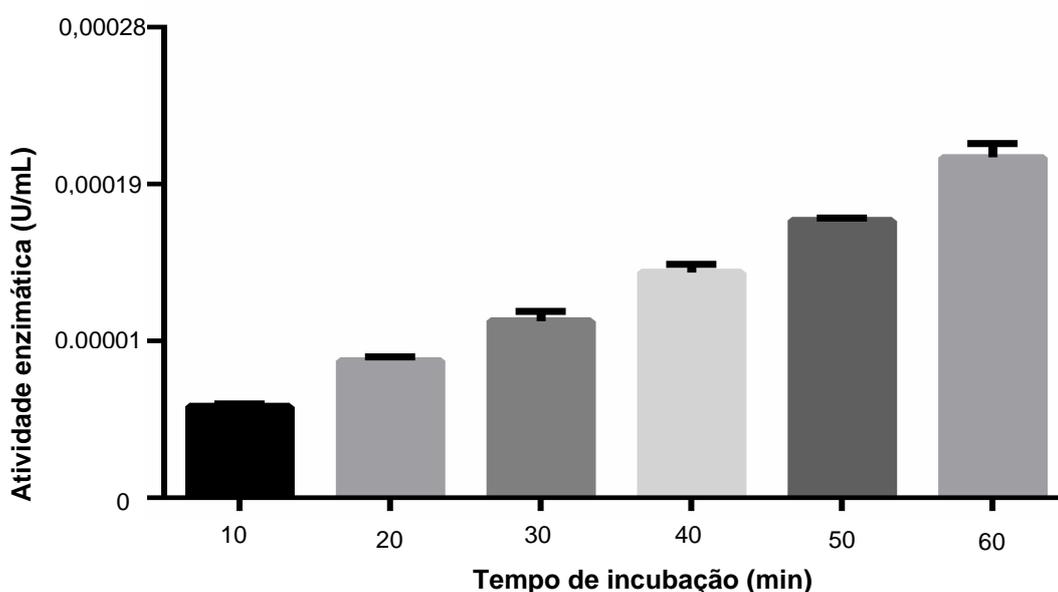
Embora seja fundamentada a utilização de enzimas em indústrias químicas, a vulnerabilidade destas proteínas a oxidação espontânea por oxigênio gasoso e, a presença de íons metálicos pode induzir uma ineficiência na atividade enzimática de algumas delas, de forma que a adição de agentes quelantes, ou substâncias redutoras se torna necessária, elevando significativamente os custos finais da produção (TOMAR et al., 2008).

Entretanto, confrontando-as com outras enzimas, tem-se que as serino proteases não necessitam do uso adicional de redutores químicos e agentes quelantes, visto que sua taxa de hidrólise se mostra em níveis satisfatórios, mesmo quando submetidas à presença de substâncias surfactantes, ou em valores extremos de pH e temperatura (AHMED et al., 2009). Devido a essa característica

particular, as serino proteases se mostram na atualidade com elevado potencial biotecnológico; sobretudo, aqueles envolvidos no processamento do leite e derivados (LI et al., 2018).

Verificado a direta relação entre a concentração enzimática e formação de *p*-nitroanilina, observou-se sobre as mesmas condições, o efeito do tempo de incubação na processabilidade do substrato BApNA. (Figura 18).

Figura 18 Atividade hidrolítica do extrato de *C. stipularia*, efeito do tempo de incubação perante a hidrólise do substrato BApNA



Fonte: elaborada pelo autor, 2020

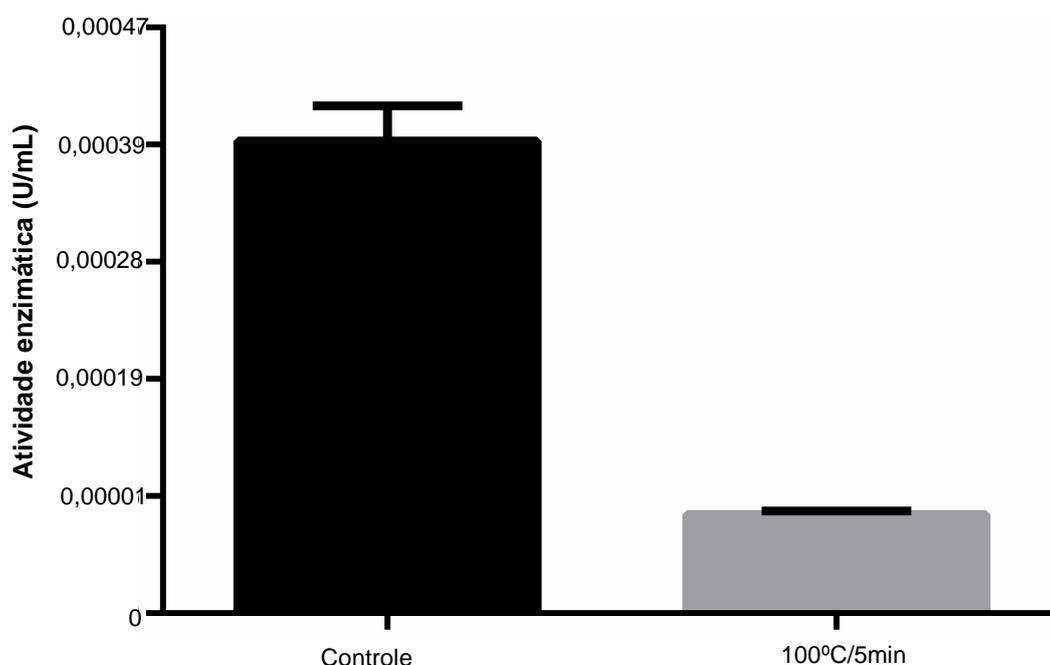
Conforme os resultados mostrados, vemos que o tempo de incubação foi muito efetivo para a maior conversão do substrato em produto, e mesmo após 60 min, a enzima se manteve estável, apresentado a maior unidade de atividade, quando comparada com os demais tempos de reação. Esse tipo de comportamento cinético é muito importante em enzimas com aplicação industrial, pois assegura uma maior eficiência catalítica do produto, bem como assegura a disponibilidade da enzima ativa por um maior período.

Vallés e Cantera (2018) mostram em seus estudos que novas tecnologias em extração e purificação de enzimas de fontes biológicas, bem como o desenvolvimento em métodos moleculares, resultaram em maior comercialização destas moléculas (enzimas), fornecendo-as como bioprodutos de vasta aplicação comercial. Feijoo-Siota e Villa (2011) reportam que a produção de proteases é uma

real necessidade por parte do setor industrial e, que a sua comercialização corresponde hoje cerca de 60% de todo o montante produzido.

A literatura aponta que a estabilidade estrutural de uma enzima está intimamente associada ao grau de agitação cinético dos átomos constituintes, onde a temperatura assume importante papel nesse comportamento termodinâmico (DEVLIN, 2011). Assim, após verificação do efeito da concentração, efetuou-se um estudo cinético, com o intuito de avaliar o efeito da temperatura sobre a atividade hidrolítica da protease extraída das sementes da *C. stipularia* e, através disso, analisar a estabilidade da molécula proteica, quando submetida a extremos de temperatura. (Figura 19).

Figura 19: Atividade hidrolítica do extrato de *C. stipularia*: efeito da temperatura perante a hidrólise do substrato BApNA



Fonte: elaborada pelo autor, 2020

Em termos práticos, tem-se que as proteínas evoluíram para atuar em determinados ambientes celulares, que por outro lado, condições adversas àquelas da célula, podem resultar em mudanças estruturais em diferentes níveis. A modificação da estrutura tridimensional suficiente para causar a perda da função é chamada de desnaturação (NELSON e COX, 2013) e, os autores ainda mostram que a maioria das proteínas pode ser desnaturada pelo calor, que tem efeitos complexos nas fracas ligações da molécula. Sobretudo, ainda que sofra a influência desestabilizadora por parte da elevação da temperatura, algumas proteínas

desnaturadas reassumem suas estruturas nativas, assim como suas atividades biológicas, fenômeno denominado de renaturação (NELSON e COX, 2013).

Note que após aquecimento da amostra, a enzima não efetivou a perfeita conversão do substrato, corroborando assim, com os resultados alcançados por Chen et al., (2018) onde afirmam a influência do aumento da temperatura na inativação de proteases ativas em sementes de amendoim, em que a alta temperatura promoveu a desestabilização estrutural na molécula. Nesta condição, as interações repulsivas são maximizadas, ao passo que as atrativas são reduzidas gradativamente.

Vale salientar que após o aquecimento, a enzima foi resfriada à temperatura ambiente e, incubada a 37 °C, mediante adição contra o substrato BApNA. Entretanto, ainda com a otimização da temperatura à condições reacionais, a molécula não conseguiu regenerar a sua estrutura tridimensional de início, mostrando que nestas condições, ela não apresentou capacidade de renaturação.

## **5.2 Efeito da Maturação das Sementes Sobre a Atividade Proteolítica do Extrato de *C. stipularia***

Bem como em outros tipos de organismos, as proteases de plantas desempenham uma importante função em gerar aminoácidos livres a partir de moléculas polipeptídicas. Assim, é muito comum observamos a transformação de macromoléculas biologicamente ativas em aminoácidos não funcionais. Nessa perspectiva, percebe-se que as proteases assumem um papel central na regulação e destino de outras proteínas, controlando em inúmeras respostas, ao desenvolvimento do microambiente que atuam (VAN DER HOORN, 2008).

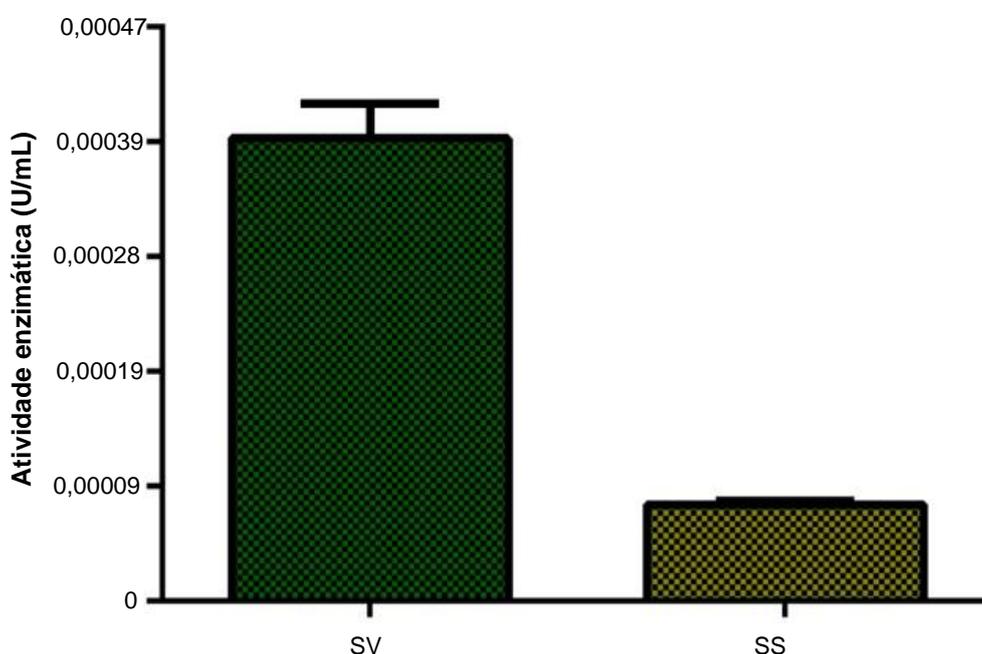
Parafraseando Thomas e Hoorn (2018) a clivagem proteica é, portanto; vista como uma irreversível mudança pós-traducional e, que em casos extremos, a sua ação pode ocasionar a desorganização celular por parte de alguns organismos. Esse efeito, é claro, age em detrimento da alta especificidade existente nos sistemas biológicos. No entanto, de maneira sumária, a sua ação atende a princípios reguladores, por meio da alocação de domínios proteicos, até a redistribuição de nitrogênio intracelular (DIAZ-MENDOZA et al., 2016).

Os autores ainda retratam que de forma endógena, a senescência em vegetais representa um mecanismo fisiológico espontâneo, que é centrado na desconstrução estrutural de algumas moléculas, de modo a serem redistribuídas

para a nutrição e crescimento do organismo vegetal. Todos esses fenômenos são proporcionados pela reprogramação genética, os quais promovem a ação de diferentes enzimas hidrolíticas, responsáveis pelo metabolismo de proteínas, lipídios, ácidos nucleicos e pigmentos não ativados (DIAZ-MENDOZA et al., 2016).

Assim, vislumbrando uma análise mecanística da ação das proteases séricas presentes nas sementes de *C. stipularia*, realizou-se um estudo comparativo da hidrólise do BApNA em diferentes estágios de maturação da semente (Figura 20).

Figura 20: Atividade hidrolítica do extrato de *C. stipularia*, efeito da maturação das sementes na atividade proteolítica

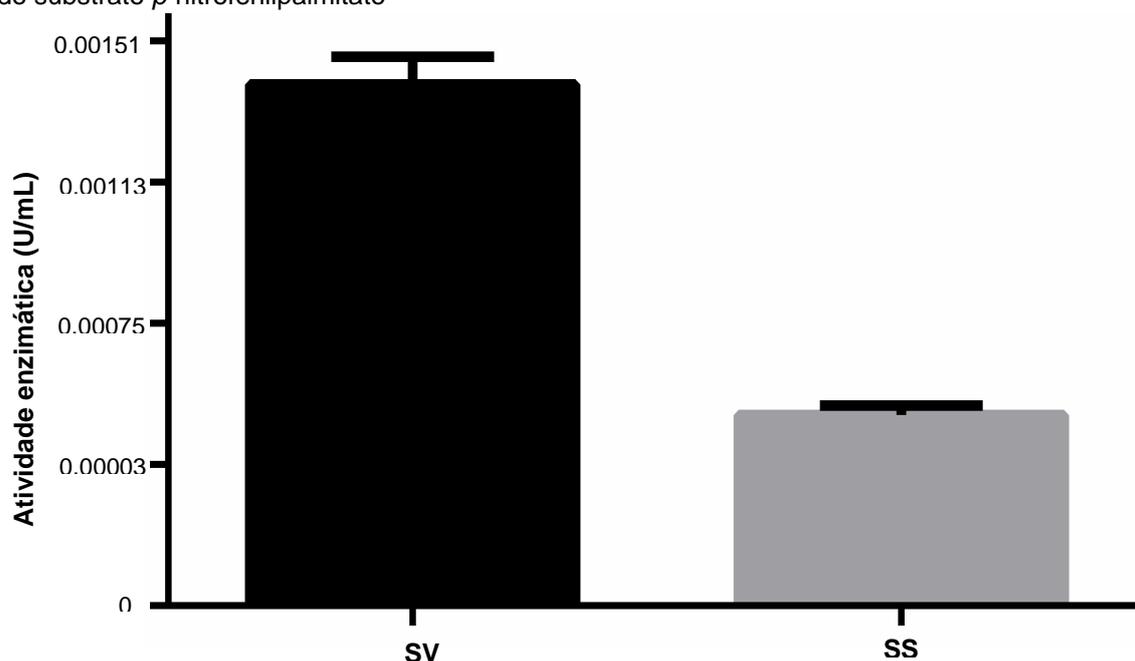


Fonte: elaborada pelo autor, 2020

Vemos de modo detalhado, que a taxa de hidrólise do substrato foi expressivamente maior com as sementes no estágio inicial de maturação e, este resultado, por sua vez, pode estar associado a participação da enzima no processo de desenvolvimento e senescência da espécie, conforme visto em relato supracitado.

Essa observação, sob a ótica do experimento executado, é ainda fortalecida quando confirmamos a existência de maior atividade lipolítica nas sementes verdes de *C. stipularia*, em comparação com as de estágio de maturação mais avançado (Figura 21).

Figura 21: Atividade hidrolítica do extrato de *C. stipularia*, efeito da sazonalidade perante a hidrólise do substrato *p*-nitrofenilpalmitato



Fonte: elaborada pelo autor, 2020

Desta forma, podemos verificar que os relatos apontados por Diaz-Mendoza et al., (2016) se aplicam a espécie vegetal usada em nossa pesquisa, de forma que a protease encontrada nas sementes de *C. stipularia*, muito provavelmente, esteja agindo no desenvolvimento da planta, através da distribuição de aminoácidos livres e, o processamento de estruturas polipeptídicas.

É claro que outros experimentos devem ser realizados, como forma de esclarecimento e validação das hipóteses levantadas. Sobretudo, considera-se que para continuidade do estudo, o efeito da sazonalidade foi de fundamental importância, por nos possibilitar a utilização de material biológico com máxima atividade proteolítica existente.

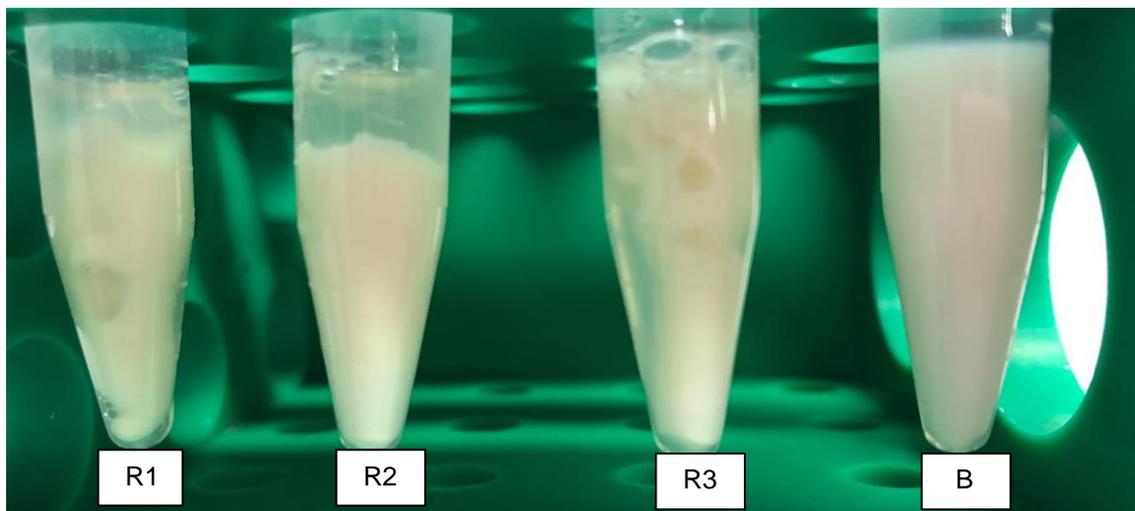
### 5.3 Aplicação Biotecnológica para o EB da Espécie *C. stipularia*

#### 5.3.1 Teste de coagulação em leite desnatado

Através da metodologia usada, podemos observar que o extrato enzimático obtido a partir das sementes verdes de *C. stipularia* mostrou ação positiva para o fim proposto, no tocante a capacidade coagulante do material, frente à proteína do leite bovino em pó desnatado, correspondendo a uma atividade específica (unidade

de coagulação por miligrama de extrato enzimático) mensurada em 74 mU (Figura 22).

Figura 22: Ação coagulante do extrato das sementes verdes de *C. stipularia*: “R1”, “R2” e “R3” representam análises em triplicata da coagulação do leite bovino em pó desnatado. “B” representa o controle negativo, em que fora adicionado o tampão Tris-HCl ao leite reconstituído.



Fonte: elaborada pelo autor, 2020

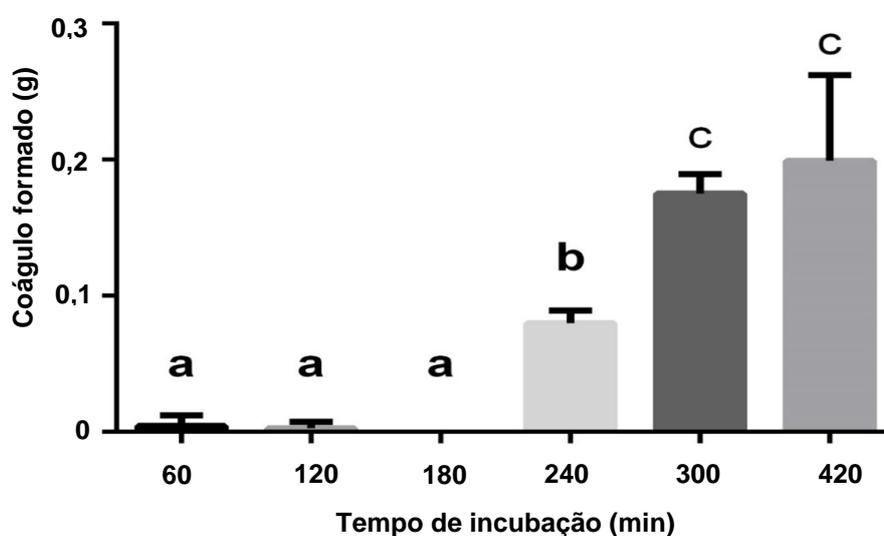
A mesma ação biotecnológica foi verificada nos trabalhos reportados por Pontual et al., (2012) e Gagaoua et al. (2017) ao mostrarem o potencial efeito coagulante em preparações de leite a partir de extratos enzimáticos de *Moringa oleífera* e *Cucumis melo var* respectivamente.

Como é observado na Figura 46, os tubos “R1”, “R2” e “R3” revelam que a preparação do leite bovino em pó foi altamente suscetível à ação da serino-protease, ao passo que em “B”, representando o controle da reação, não houve mudança constitutiva do substrato.

Desta feita, vemos que o método de extração das proteases séricas com o tampão Tris-HCl pH 8 é altamente compatível com a aplicação defendida na pesquisa, uma vez que não proporciona alterações nas propriedades físico-químicas do leite. Portanto, a coagulação visualizada no experimento reporta inteiramente a atividade hidrolítica do extrato das sementes verdes da planta *C. stipularia*.

Após validação do método e, quantificação da menor concentração de EB (0,089 mg/mL) necessária para alcançar a máxima coagulação do leite contida em 1 mL de solução, efetuamos uma análise a fim de esboçarmos uma curva de tempo do ensaio (Figura 23).

Figura 23: Curva de tempo da ação coagulante do extrato das sementes verdes de *C. stipularia*: Ambas as análises foram realizadas em triplicata e, a reação processada a 37 °C.



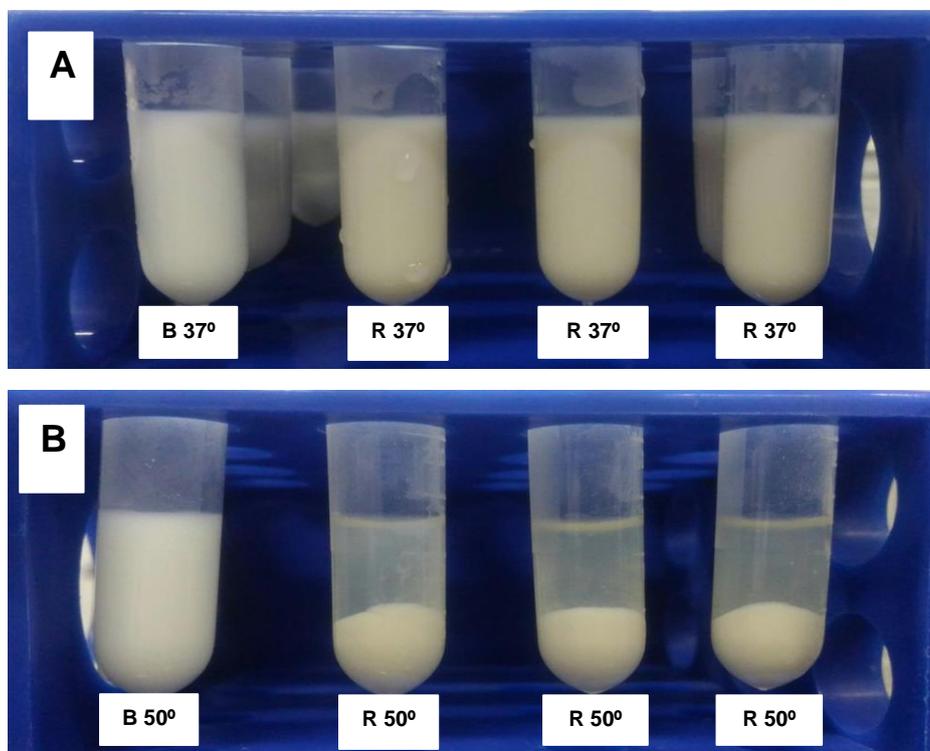
Fonte: elaborada pelo autor, 2020

Consoante à análise, podemos verificar que em 240 min já fora possível visualizar a formação do coágulo em grandes proporções e, em 300 min, a caseína sofreu a coagulação em sua totalidade. Observamos também que mesmo em maiores períodos de incubação (420 min) a massa de coágulo formada não reportou diferença significativa, quando comparada com o período de 300 min (análises estatísticas determinadas por GraphPad Prism).

### 5.3.2 Efeito da temperatura no processo de coagulação do leite

Boa parte dos catalisadores biológicos apresentam mecanismos de hidrólise diferenciados, à medida que a temperatura do sistema é alternada. Em se tratando das serino proteases, vemos que estas enzimas assumem clássica estabilidade, quando expostas a condições de reação à temperatura moderadamente elevada (KUMARI, SHARMA e JAGANNADHAM, 2010). Frente a isso, foi avaliada a atividade coagulante do EB a 37 e 50 °C (Figura 24).

Figura 24: Temperatura ótima da ação coagulante do extrato das sementes verdes de *C. stipularia*: (A): “B37°” representa o controle negativo incubado a 37 °C; “R37°” correspondem às análises em triplicata da coagulação do leite reconstituído. (B): “B50°” refere-se ao controle negativo incubado a 50 °C, ao passo que “R 50°” representam as reações em triplicata da atividade coagulante do extrato enzimático das sementes de *C. stipularia* a 50 °C.



Fonte: elaborada pelo autor, 2020

Conforme esquematizado na figura, a atividade catalítica do material se mostrou mais pronunciada a 50 °C (94mU), antecipando a reação em 120 min, quando comparado com a coagulação alcançada a 37 °C. O mesmo comportamento foi reportado no trabalho de Kumari, Sharma e Jagannadham (2010) que mostraram atividade ótima de uma serino protease isolada da planta *Ficus religiosa* em 50 °C, mediante ensaio de coagulação de leite.

É importante destacar que para esta pesquisa, o tempo de reação considerado foi associado à coagulação completa de todo o substrato e, não necessariamente, ao instante inicial que os coágulos eram formados. Esse tipo de detecção foi tomado como referência para os cálculos de atividade, em virtude de termos obtidos ação coagulante com o extrato vegetal a partir de mínimas concentrações proteicas (0.089mg/mL de enzima).

Por outro lado, diferentemente dos resultados aqui obtidos, destaca-se o trabalho de Pontual et al. (2012) em que alcançaram atividade coagulante com os

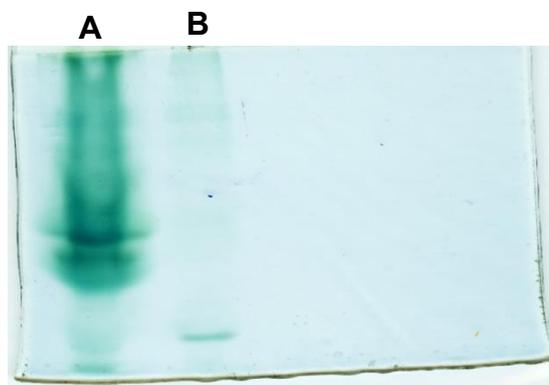
extratos das flores de *M. oleífera* a partir da concentração proteica estimada em 1,28mg/mL, cerca 14 vezes maior quantidade de proteína, ao requisitado em nossa pesquisa. Tal estimativa revela importante característica da protease de *C. stipularia*, que é a sua alta especificidade pela proteína do leite bovino desnatado.

Vale ressaltar que após aquecimento a 100 °C, a atividade coagulante do EB foi reduzida em 100%, o que mostra que a metodologia defendida nesta pesquisa refere-se exclusivamente a ação das proteases contidas no material e, não necessariamente, a participação dos metabólitos secundários, uma vez que ao ser aquecida, a enzima perde a sua estrutura nativa, coibindo diretamente a ação catalítica (dado não mostrado).

### 5.3.3 Verificação da hidrólise de caseína por eletroforese e dosagem de proteínas solúveis residuais

O potencial do novo coagulante de leite extraído das sementes de *C. stipularia* também foi avaliado em função do perfil de proteínas expressos em gel de poliacrilamida, por meio de eletroforese em SDS-PAGE (Figura 25).

Figura 25: Verificação de atividade coagulante por meio de eletroforese em SDS-PAGE: na canaleta “A” mostra-se o perfil de proteína do leite reconstituído no início da incubação; na canaleta “B” verifica-se o perfil de proteína do soro após a completa coagulação do leite.

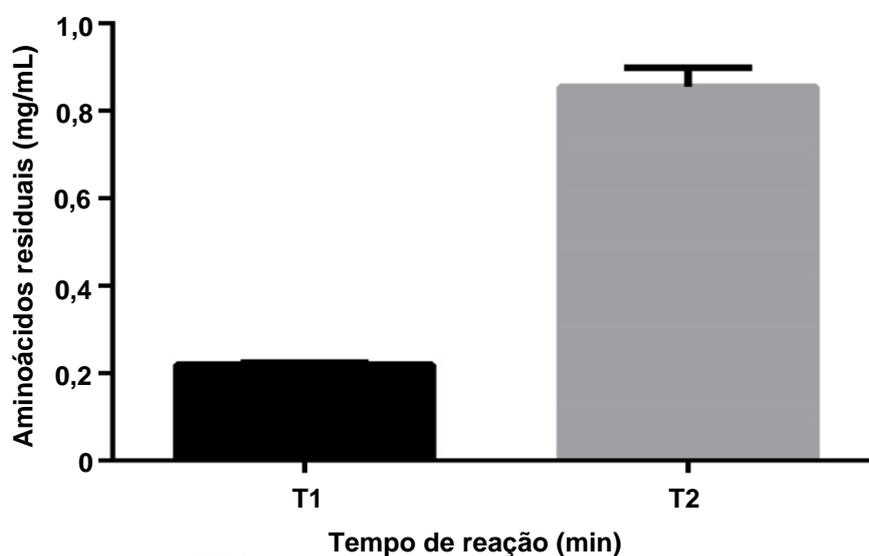


Fonte: elaborada pelo autor, 2020

Através deste resultado, podemos inferir que apesar de ser uma solução reconstituída, a preparação de leite bovino possui pujante conteúdo proteico (canaleta “A”) ao passo que na canaleta “B”, representando o soro gerado na reação, visualizamos em maior realce uma única banda corada em comassie, indicando-nos que para este substrato, a protease sérica apresentou alta processabilidade enzimática. Resultados semelhantes também foram reportados por Farias et al. (2020) quando analisaram o potencial do Noni (*Morinda citrifolia* L) como novo coagulante de leite.

Durante a hidrólise, algumas enzimas além de desestabilizar as micelas da caseína, podem desencadear a hidrólise ao longo da cadeia polipeptídica desta e, de outros polipeptídios, de forma que o conteúdo de aminoácidos livres do soro seja elevado à medida que a reação de coagulação se processa. Diante desta característica, foi avaliada a processabilidade do extrato vegetal pelo aumento de aminoácidos residuais solúveis no soro do leite, através de quantificação pelo método de Bradford (Figura 26).

Figura 26: Dosagem de proteínas residuais: a análise foi obtida por meio de quantificação de proteínas com o soro do leite em diferentes intervalos de tempo, “T1” representa o soro do leite no tempo zero de incubação; “T2” refere-se à quantificação de aminoácidos residuais no soro do leite quando verificado a coagulação total do leite reconstituído.



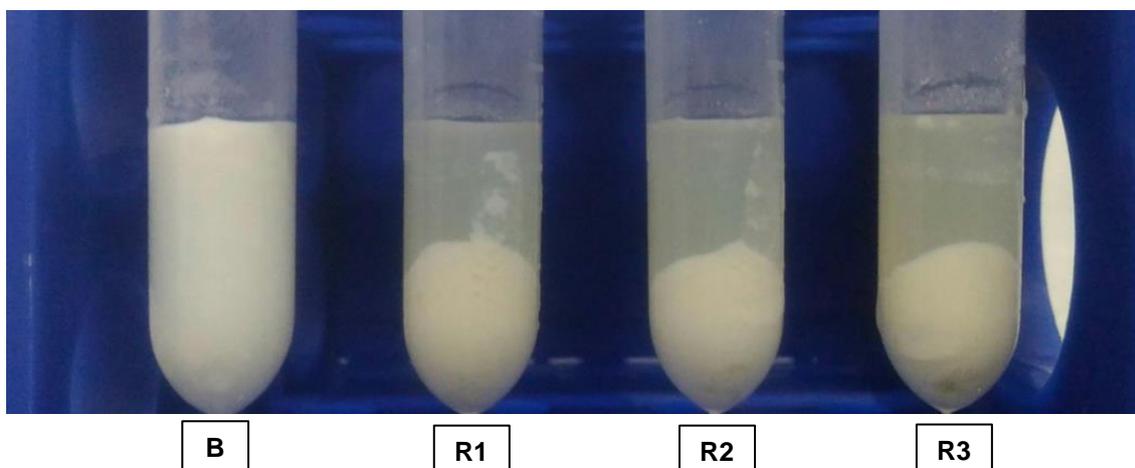
Fonte: elaborada pelo autor, 2020

Confrontando os resultados da eletroforese em gel de poliacrilamida e, dosagem de aminoácidos residuais, vemos que ambos os experimentos convergem para a hipótese de que o extrato vegetal obtido das sementes da planta *C. stipularia*, promove a coagulação completa do quantitativo de caseínas solúveis no leite e, que durante a hidrólise, grandes quantidades de aminoácidos são liberados no soro, enriquecendo nutritivamente o subproduto da reação.

#### 5.3.4 Teste de coagulação de leite integral pasteurizado e influência da diálise na ação coagulante

Uma vez confirmado a direta participação da serino protease na coagulação do leite desnatado, realizamos um ensaio equivalente com leite integral bovino pasteurizado (Figura 27).

Figura 27: Ação coagulante do extrato das sementes verdes de *C. stipularia*: “R1”, “R2” e “R3” representam análises em triplicata da coagulação do leite integral bovino pasteurizado. “B” representa o controle negativo, em que fora adicionado o tampão Tris-HCl ao leite.

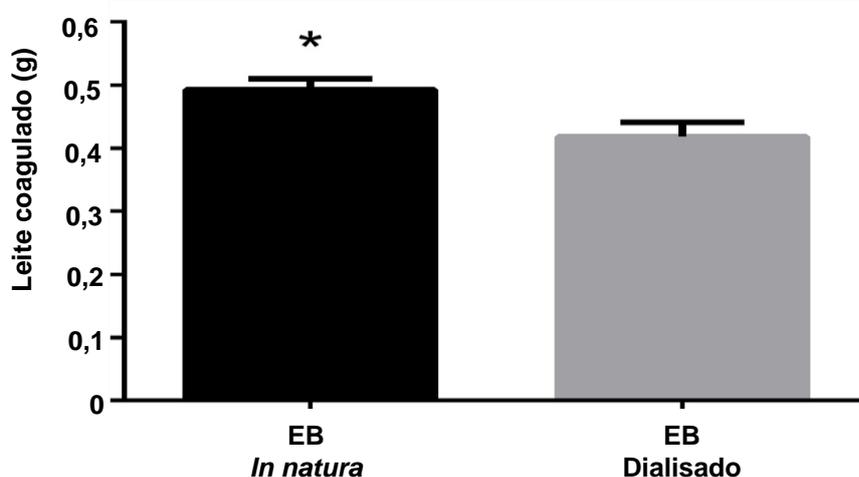


Fonte: elaborada pelo autor, 2020

Assim, por meio do experimento executado, podemos verificar que o extrato enzimático foi altamente efetivo em processar o substrato. Além disso, sob o aspecto da eficiência catalítica, apresentou uma atividade coagulante específica de 22.472mU, equivalente a 239 maior unidade de coagulação, quando comparado com o processamento em leite desnatado.

Além de esboçarmos a atividade coagulante do EB *in natura*, decidimos verificar se a retirada de metabólitos secundários, por meio de diálise, provocaria interferência no potencial ação da serino protease. Os testes de coagulação do extrato *in natura* e dialisado seguiram os mesmos protocolos descritos nos experimentos anteriores (Figura 28).

Figura 28: Influência da diálise na ação coagulante do EB de *C. stipularia*: o EB dialisado foi obtido através de diálise com membrana semipermeável.



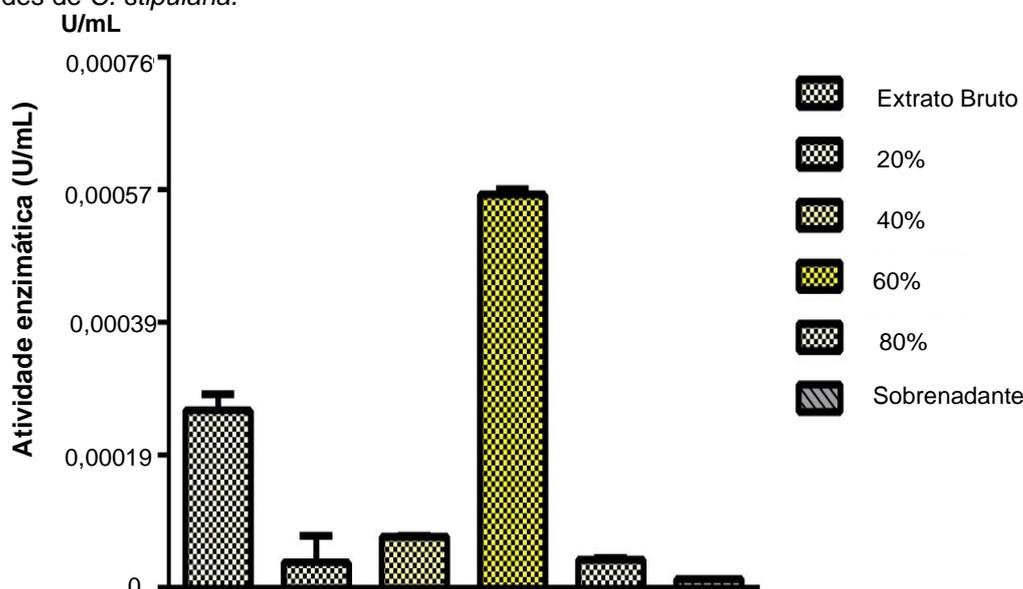
Fonte: elaborada pelo autor, 2020

De acordo com os resultados mostrados na figura, podemos verificar que o processo de diálise promoveu uma mínima redução na coagulação do leite, mostrando que a protease sérica presente no extrato das sementes verdes de *C. stipularia* suporta esse tipo de tratamento, ao mesmo tempo em que minimiza a quantidade de metabólitos presentes na preparação enzimática. Semelhantemente a esta estabilidade verificada em nosso estudo, destaca-se o trabalho reportado com o extrato enzimático de *M. oleífera*, onde confirmaram a manutenção do potencial coagulante das enzimas séricas após serem induzidas à diálise, para a retirada de sais precipitantes (PONTUAL et al., 2012).

#### 5.4 Precipitação com Sulfato de Amônio

Com a certificação do provável potencial biotecnológico, decidimos avaliar; em maior detalhamento, os metabólitos primários responsáveis por essa ação proteolítica, mediante estratégias de precipitação de proteínas, assistidas por métodos cromatográficos. Assim, destinou-se o material à precipitação com sulfato de amônio, conforme discutido no tópico 4.4.1 (Figura 29).

Figura 29: Precipitação salina com sulfato de amônio para o extrato obtidos a partir das sementes verdes de *C. stipularia*.



Fonte: elaborada pelo autor, 2020

Observe que a técnica utilizada foi bastante efetiva, de modo que a protease se manteve concentrada numa única fração de precipitação, correspondente a 60% de saturação. Tomando como referência os valores obtidos para o extrato bruto, tem-se que a recuperação para este método alcançou valor aproximado a 55,41%.

A utilização de sulfato de amônio como etapa preliminar na purificação de proteases em plantas é algo bastante utilizado e, que o seu perfil, segue como via de regra, a característica estrutural dos próprios aminoácidos presentes. Salvador, Novo e Domingos (2006) em trabalho destinado a purificação de proteases de *Centaurea calcitrapa*, utilizaram o sulfato de amônio equivalente a saturação de 30-80% (m/v); Jalali et al., (2015) purificaram uma protease extraída das sementes de *Plodia interpunctella*, com 80% de saturação, e Li et al., (2018) verificaram a importante influência do uso de sulfato de amônio (65% de saturação) na purificação de protease dos frutos de tamarilo.

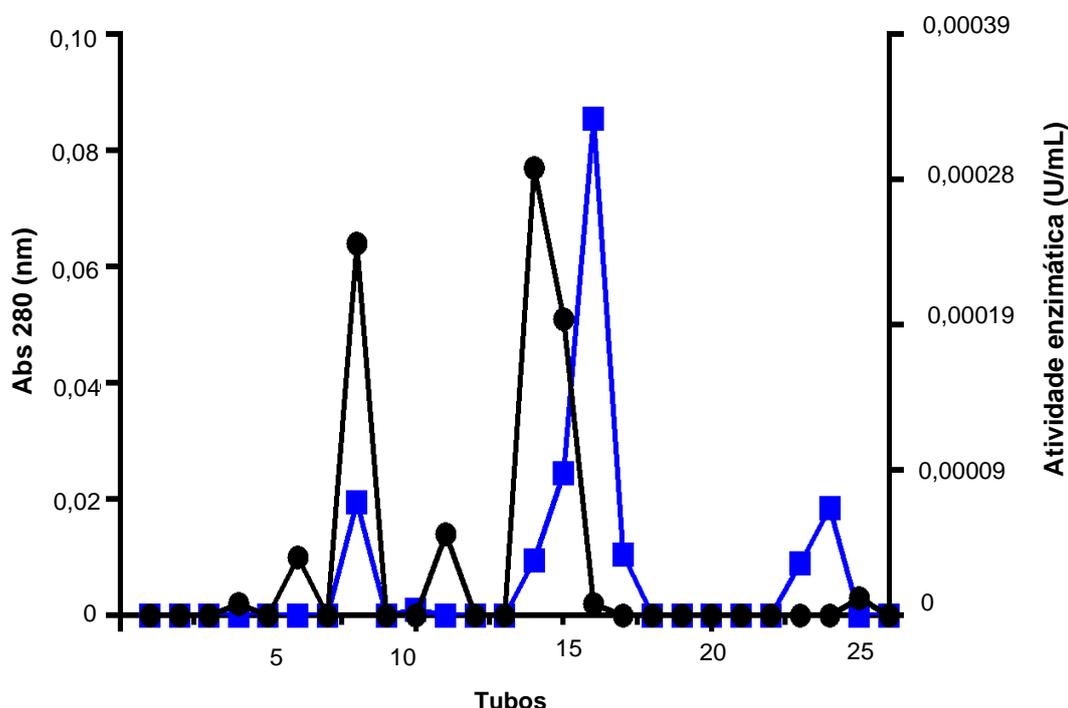
### **5.5 Cromatografia Líquida: S-100 Sephacryl**

Após precipitação salina com sulfato de amônio, a fração com maior atividade específica foi dialisada em tampão Tris HCl, para a retirada de sais e, posteriormente, concentrada em polietileno glicol (PEG). Ambos os procedimentos são de fundamental importância, pois nos assegura que a amostra a ser cromatografada esteja nas mesmas condições que a resina cromatográfica. Posteriormente, aplicou-se a amostra numa gel-filtração, onde todas as proteínas foram eluídas em sistema isocrático, separadas em função de sua massa molecular (Figura 30).

De acordo com os resultados mostrados, vemos que a cromatografia separou as proteínas com significativa resolução e, que nos tubos 15, 16 e 17 estiveram presentes as maiores atividades de hidrólise, totalizando uma recuperação aproximada em 159%. Embora tenhamos avaliado a absorbância de todos os tubos coletados a A<sub>280</sub> nm, a forma mais eficaz para certificação da localidade da enzima estudada seria por meio do ensaio enzimático, até porque, o cromatograma revelado pode estar sujeito a interferência de pigmentos e outros metabólitos com elétrons deslocalizados.

Por se tratar de uma técnica não adsortiva, a gel filtração favorece a separação das proteínas em função de suas respectivas massas, entretanto, a depender da complexidade molecular existente na amostra, podemos verificar a associação deste material com a fase estacionária. No objetivo de minimizar a provável interação de proteínas pela resina, utilizamos adicionado ao tampão de eluição 0,5M de NaCl.

Figura 30: Cromatograma S-100 Sephacryl, pós-Sulfato de amônio (*C. stipularia*): Cromatograma (S-100 Sephacryl): (A280) perfil de eluição de proteínas (linha preta). Atividade enzimática em U/mL (linha azul).



Fonte: elaborada pelo autor, 2020

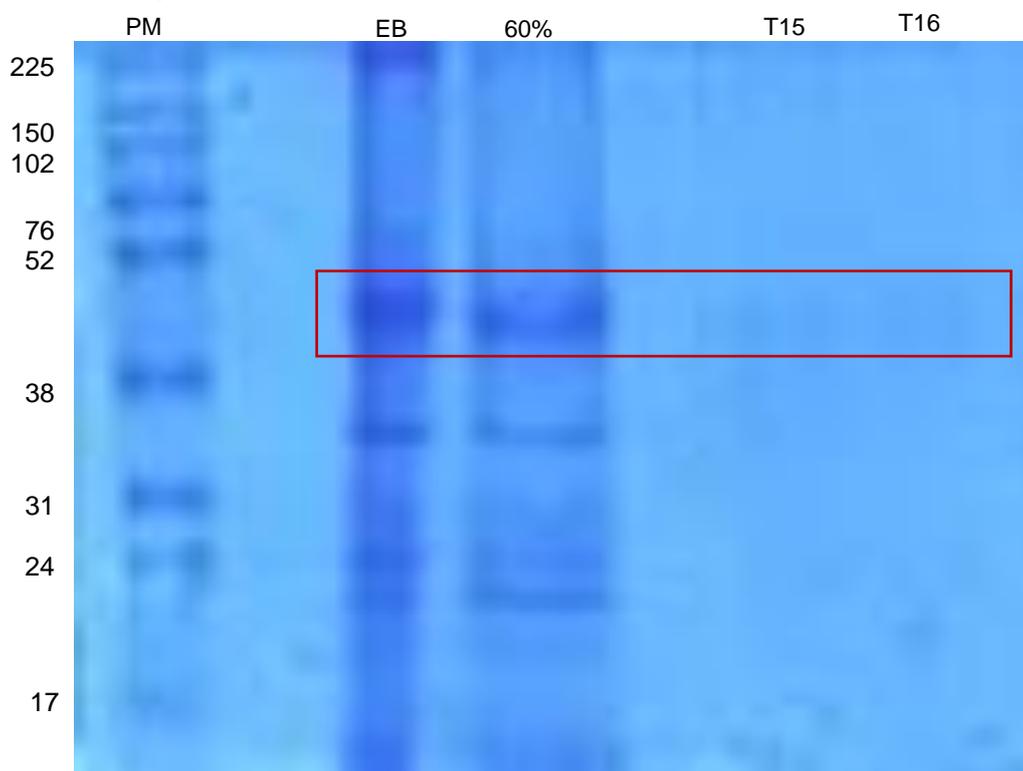
Sobretudo, durante a execução experimental, percebeu-se a obstrução do fluxo, de modo que se fez necessário um novo empacotamento da coluna, precedido de sucessivas lavagens com ácidos e bases, conforme especificado pela empresa fabricante (GE Healthcare).

A purificação de proteínas, por via de regra, é uma técnica bastante dispendiosa, principalmente pelos custos atribuídos às resinas cromatográficas. Assim, é muito importante que haja um planejamento da rota a seguir e, que essa não provoque o comprometimento do equipamento e demais suprimentos químicos necessários ao estudo.

## 5.6 Eletroforese em Gel de Poliacrilamida

Após a regeneração do equipamento (cromatógrafo) foi avaliado, por meio de eletroforese em gel de poliacrilamida, o perfil de proteínas existente nos tubos coletados com maiores atividades enzimáticas específicos (Figura 31).

Figura 31: Eletroforese: SDS-PAGE (12%) da protease purificada a partir das sementes de *C. stipularia*. Canaleta 1: Padrão de massa; Canaleta 2: Extrato bruto; Canaleta 3: Fração 60% do fracionamento salino; Canaleta 4: Tubo 15 (T15); Canaleta 5: Tubo 16 (T16). A eletroforese foi processada a voltagem constante (90 mV), e as bandas foram coradas com Coomassie.



Fonte: elaborada pelo autor, 2020

Visualizando a Figura 55, podemos observar que mesmo havendo obstrução momentânea da coluna S-100 Sephacril, o isolamento foi bastante efetivo na purificação da enzima, onde podemos notar uma só banda nas canaletas em que foram aplicados os tubos com maiores atividades específicas (T15 e T16), com massa estimada em 45 kDa aproximadamente. Consoante a este resultado, destacamos os trabalhos de Pande et al., (2006) com a serino protease (50,5 kDa) isolada do *Cryptolepis buchanani*; Yadav, Pande e Jagannadham (2006) *Euphorbia milii* (51 kDa); Kumari et al., (2010) *Ficus religiosa* (43 kDa).

Na canaleta 1 (PM) (esquerda para a direita) mostra-se o padrão de massa molecular. Observe que as proteínas existentes neste padrão apresentam diferentes massas moleculares e, foi por meio desta característica, que conseguimos durante o experimento, fracionar estas moléculas em diferentes momentos, uma vez que se aplica uma corrente sobre o sistema.

Na canaleta 2 (EB) foi posto o extrato bruto. Note que há uma alta complexidade de proteínas extraídas durante o preparo do extrato. Tal resultado

também pode ser atribuído à forma com que o material foi obtido, onde se aplicou uma desconstrução tecidual de todas as sementes, favorecendo assim, a liberação no tampão de moléculas presentes no interior da célula vegetal.

Na canaleta 3 (60%) tem-se a fração advinda da precipitação salina, onde podemos observar a resolução da amostra em três principais proteínas, cujas massas moleculares são bem distintas. Finalmente, temos nas canaletas 4 e 5 os tubos 15 e 16, em que foram constatadas as maiores atividades de hidrólise do substrato BApNA.

Jellouli et al., (2009) apontam que a massa molecular de proteases séricas pode variar, em sua maioria, de 23-28 kDa, mas que a depender da espécie estudada, algumas variações podem ocorrer, principalmente quando há a formação de estruturas supramoleculares, gerando no fim, um ordenamento de alta massa molecular, a exemplo das glicoproteínas (AHMED et al., 2009)

Algumas proteínas possuem além dos resíduos de aminoácidos, outras estruturas orgânicas associadas, como glicoproteínas (associadas a moléculas de carboidratos) e lipoproteínas (lipídeos associados). No caso das glicoproteínas, a porção glico carboidratada pode ser parte da arquitetura carbônica de uma enzima purificada e, em alguns casos, pode desencadear, além do aumento da massa molecular, uma maior estabilidade catalítica, quando submetida a elevação térmica (AHMED et al., 2009). Essa característica estrutural é encontrada em muitas proteínas, sendo que entre as enzimas purificadas de plantas, a maior incidência ocorre entre as Serino proteases, conforme destacado nos trabalhos de Pande et al., (2006); Yadav, Pand e Jagannadham (2006), Tomar et al., (2008).

Em ambos os casos, a variação de massa molecular não modificou a cinética reacional da enzima, de forma que a tríade catalítica se manteve inalterada. Vale salientar que a utilização de eletroforese em gel de poliacrilamida não favorece, de forma detalhada, a certificação da massa da enzima que se estuda e, que o sequenciamento dos aminoácidos, por meio da espectrometria de massas, seria uma estratégia de melhor esclarecimento sobre essa informação.

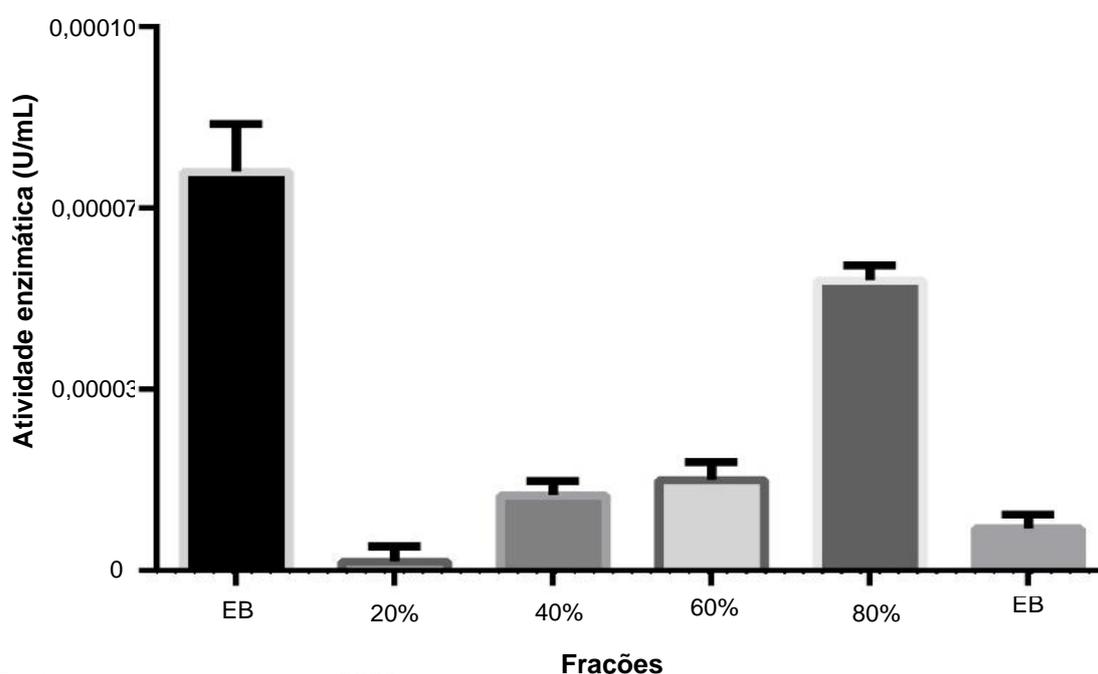
### **5.7 Precipitação com Solventes Orgânicos (Acetona e Etanol)**

Como se sabe, inúmeras estratégias podem ser utilizadas como etapa preliminar da cromatografia líquida, de modo a tornar a amostra o mais simplista possível, à medida que os contaminantes são retirados. Assim, por advento do

entupimento da coluna, decidimos executar demais rotas de purificação, avaliando-as separadamente, quanto a exatidão em favorecer a purificação da enzima, sem comprometer a integridade funcional dos equipamentos usados no experimento.

De início, avaliou-se a utilização comparativa de diferentes solventes orgânicos (acetona e álcool). A primeira precipitação orgânica foi efetuada com o álcool etílico, seguido de ensaio enzimático a cada uma das frações obtidas (Figura 32).

Figura 32: Precipitação com etanol: O extrato bruto de *C. stipularia* foi submetido a precipitação com etanol, a 15000xg 15 min a 4°C. as frações obtidas foram reunidas e determinado a atividade proteolítica para cada uma delas, tomando como substrato o BApNA.



Fonte: elaborada pelo autor, 2020

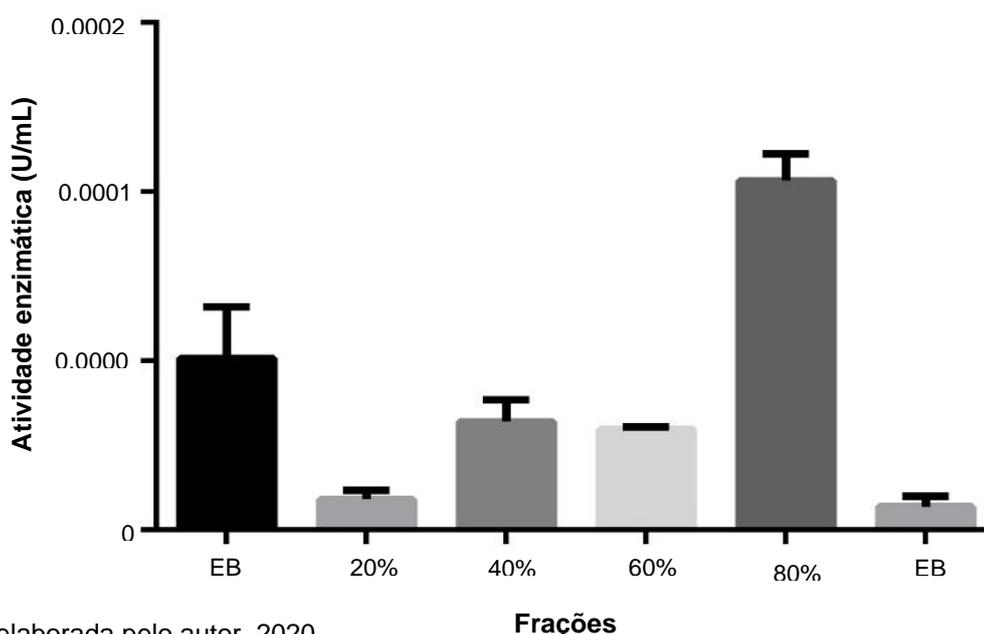
Através do monitoramento reacional, pôde-se observar que o experimento alcançou boa resolução, visto ter concentrado a atividade específica numa só fração, equivalente a 80% de saturação (v/v). Entretanto, ao corroborar com a atividade aferida ao extrato bruto, percebemos uma taxa de recuperação de apenas 5,45%.

Em momentos anteriores, vimos que a maneira com que as proteínas são fracionadas está diretamente relacionada ao enovelamento tridimensional e, de quais aminoácidos ocupam a face externa da estrutura globular. Entretanto, em se tratando de extratos vegetais, tem-se que a quantidade de metabólitos secundários pode interferir drasticamente na atividade final da enzima, de forma que a ação do

solvente orgânico poderá induzir uma maior incorporação destes metabólitos junto a enzima, resultando no fim do processo, a sua inativação.

De maneira semelhante, avaliamos para o mesmo extrato, o efeito da precipitação com solvente acetona, certificando a sua capacidade em resolver à amostra, vinculada também, a recuperação no fim do experimento (Figura 33).

Figura 33: Precipitação com acetona: O extrato bruto de *C. stipularia* foi submetido a precipitação com acetona, a 15000xg 15 min a 4°C. as frações obtidas foram reunidas e determinado a atividade proteolítica para cada uma delas, tomando como substrato o BApNA.



Fonte: elaborada pelo autor, 2020

Como se nota, os perfis de precipitação para ambos os solventes mostraram ligeira similaridade, em que a maior atividade enzimática esteve presente na fração 80% (v/v). Por outro lado, por meio da análise da taxa de recuperação, observa-se que nesta precipitação, a protease sérica purificada teve maior estabilidade (20% de recuperação) quando corroborada com aquela utilizada em etanol.

Após realização da precipitação diferenciada com os dois solventes orgânicos, tomou-se a fração advinda do fracionamento com acetona para posterior análise cromatográfica em DEAE-Shepharose, visto que o material apresentava, anteriormente, interação pela resina S100-Shephacril. Para esse procedimento, foram tomados 300µL da fração 80% (v/v acetona) e posto para dialisar em tampão Tris-HCl 50mM pH 8,0 o mesmo usado no equilíbrio da coluna. O método e procedimento cromatográfico seguiu as mesmas especificações proposta por Dos Santos et al., (2016), e as proteínas eluídas, foram monitoradas em tempo real a 280nm.

A resina DEAE-Sepharose têm como grupos carregados moléculas de dietilaminoetil, alocados a polímeros de sepharose. Tal adequação molecular, faz com que esta assumam ampla estabilidade, frente às condições estabelecidas no experimento, como fluxo de eluição, pH e concentração salina (SIGMA-ALDRICH, 2016). Além de suas características operacionais, a utilização dessas resinas cromatográficas é de grande utilidade na purificação de proteínas de fontes vegetais, a exemplo de Li et al., (2018) quando realizaram a purificação de proteases dos frutos do tamarilo empregando DEAE-Sepharose como procedimento cromatográfico.

Embora existam relatos na literatura que confirmem o uso dessa resina em experimentos com amostras vegetais, observamos durante a execução do trabalho que a fração 80% imprimiu a mesma obstrução da coluna, conforme visto em ensaio preliminar com a resina S100-Saphacril, fazendo-nos concluir com isso, a incompatibilidade da metodologia ao material de estudo.

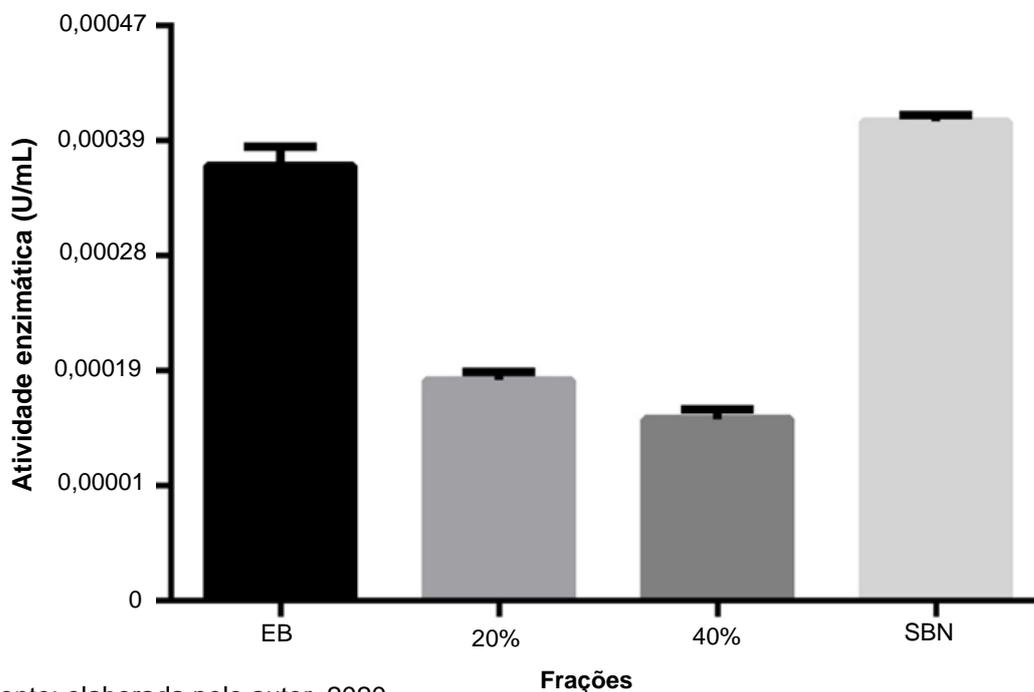
### **5.8 Sistema de Precipitação Trifásico- TPP**

Exaurida todas as propostas anteriores, decidimos efetuar nova estratégia experimental, a qual nos possibilitasse a purificação da hidrolase sem comprometer com isso, a vida útil dos equipamentos laboratoriais. Após estudo bibliográfico, decidimos adequar em nosso material, o sistema de partição trifásico (TPP), conforme descrito na seção 4.4.3.

Por ser uma metodologia complementar a precipitação salina, decidimos tomar como princípio metodológico os resultados já alcançados com a precipitação com sulfato de amônio, seção 5.4, onde pôde-se obter a enzima numa só fração de precipitação (60% de saturação) e posterior adição do álcool *t*-butanol, segundo metodologia adaptada de (DENNISON e LOVRIEN, 1997) (Figura 34).

Inicialmente, efetuamos dois fracionamentos salinos consecutivos, correspondentes a 20% e 40% de sulfato de amônio. Esse prévio tratamento foi de fundamental importância, por ter proporcionado a remoção de inúmeros contaminantes (proteínas) existentes no EB e, assim, minimizar possíveis interferências na análise.

Figura 34: Atividade enzimática, hidrólise do substrato BApNA: O extrato bruto das sementes verdes foi submetido a precipitação salina com sulfato de amônio, a 15000xg 15 min a 4°C

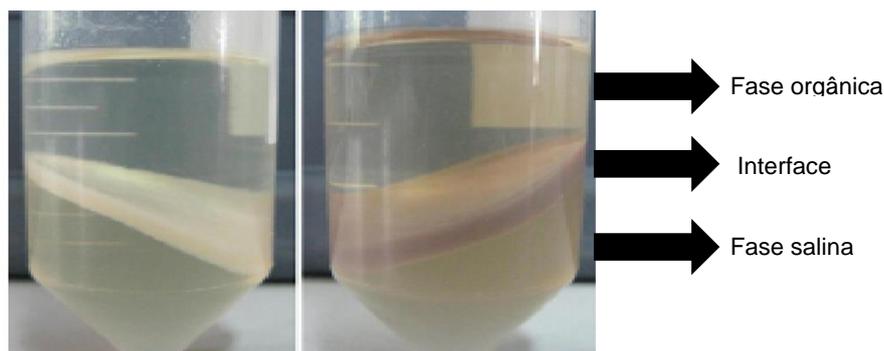


Fonte: elaborada pelo autor, 2020

Analisando a figura, percebe-se que as proteínas precipitadas com 20 % e 40% de saturação não mostraram hidrólises estatísticas para o substrato BApNA. Por outro lado, vemos no sobrenadante (SBN) uma elevada taxa de conversão.

Posteriormente, adicionou-se uma quantidade de sal equivalente a 60% de saturação, e foi mantido na geladeira por 60min. Ao término do armazenamento, adicionou-se o álcool *t*-butanol. Após agitação, foi mantido em suporte de falcon por mais 60min à temperatura ambiente. Durante o período de descanso (temperatura ambiente) pôde-se observar a separação espontânea das fases orgânica e salina, e decorrida a centrifugação, constatou-se a formação de três fases, semelhantemente ao visualizado por Wati et al., (2009) (Figura 35).

Figura 35: Perfil de precipitação em sistema de partição trifásico (TPP)



Fonte: Adaptado de Wati et al., 2020

Em nossos experimentos, realizamos a centrifugação em tubos Falcon de 15mL, em virtude da adequação ao volume de extrato aplicado no experimento. Ambas as frações obtidas, foram devidamente separadas conforme visualizado na (Figura 36).

Figura 36: Frações pós- sistema trifásico (TPP)



Fonte: Elaborado pelo autor, 2020

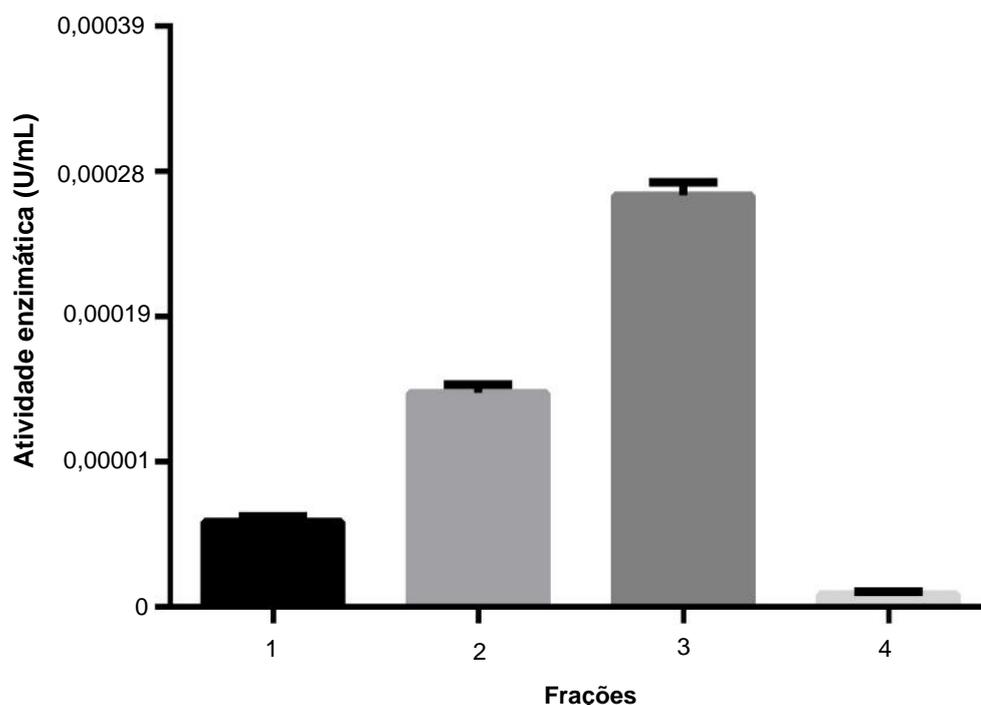
A separação das fases foi efetuada com o auxílio de uma micropipeta e, o precipitado formado (interface) foi ressuspenso em 1 mL Tris-HCl 50 mM pH 8,0. As frações obtidas foram reunidas e submetidas a ensaio enzimático.

Na Figura 37 são mostrados os resultados de hidrólise para cada fração do sistema TPP, e por meio dela, podemos observar que dentre as frações obtidas no sistema TPP, a interface foi a que maior desencadeou o processamento do substrato, representando cerca de 70% de recuperação.

Assim como discutido nos módulos anteriores, em que a forma com que as proteínas foram eluídas dependiam de suas propriedades estruturais, o mesmo fenômeno é atribuído a esta metodologia (TPP), sendo que aqui, o *t*-butanol liga-se às proteínas precipitadas (interface), aumentando assim a sua fluidez, e fazendo com que os precipitados se mantenham acima da camada salina (aquosa) mais densa.

Por outro lado, os pigmentos, lipídeos e materiais hidrofóbicos, estarão concentrados na fase superior, ao passo que os componentes polares como proteínas remanescentes, sacarídeos e eletrólitos se concentraram na fase aquosa (inferior) (SEN et al., 2011).

Figura 37: Atividade enzimática das frações do sistema de partição trifásico (TPP)



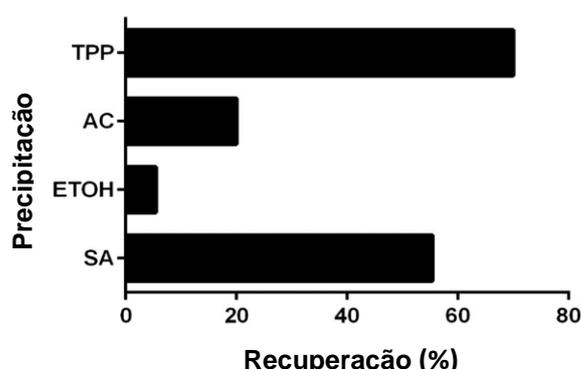
Fonte: elaborada pelo autor, 2020

Confrontando os nossos resultados com outras pesquisas reportadas na literatura, vemos que de modo semelhante, Ketnawa et al., (2014) ao purificarem proteases de vísceras de peixe, conseguiram centralizar a atividade enzimática numa só fração (interface); Rawduken, Vanabun e Benjakul (2012) ao purificarem uma protease do *Pangasianodon gigas*, obtiveram maior atividade proteolítica na interface obtida do sistema TPP aplicado. E por fim, Sen et al., (2011) ao purificarem  $\alpha$ -glicosidade do *Solanum muricatum*, também conseguiram reportar a maior atividade específica da enzima numa única fração (interface).

A princípio, se analisarmos as quatro metodologias de fracionamento aplicadas, até o momento (precipitação salina, com etanol, com acetona, e TPP), podemos aferir que ambas mostraram resultados de recuperação bem adversos (Figura 38).

Como se nota, o sistema trifásico de partição de proteína foi ligeiramente superior aos demais analisados. Tal advento, pode estar associado a ação efetiva do álcool *t*-butanol em extrair moléculas orgânicas do extrato vegetal, capazes de interferirem na reação catalisada pela enzima. Essa suposição é ainda maior, quando confrontamos este resultado com o obtido através da utilização do etanol. O álcool etílico é bem menos hidrofóbico, e a quantidade de moléculas apolares por ele extraídas é menor que a obtida em álcool de maior cadeia hidrocarbônica.

Figura 38: análise do nível de recuperação das precipitações da serino protease extraída das sementes de *C. stipularia*: Sistema de partição trifásico; AC: Acetona; ETOH: Etanol e SA: Sulfato de Amônio.



Fonte: elaborada pelo autor, 2020

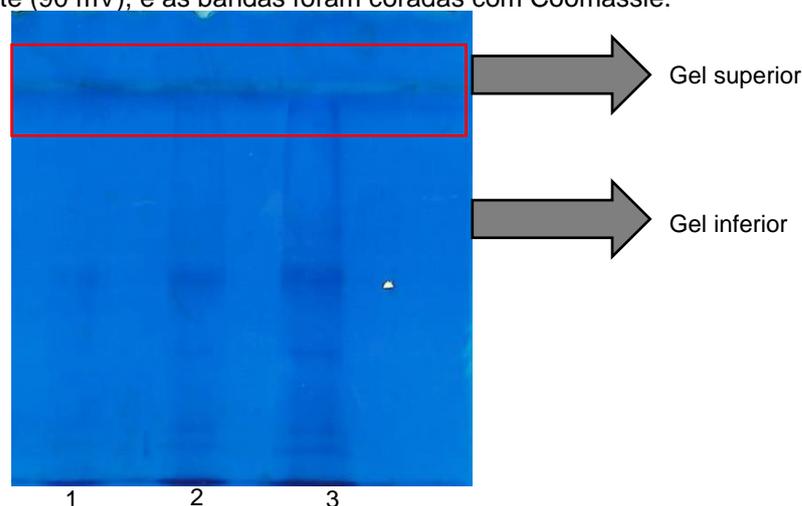
Dhananjay e Mulimani (2009) reportaram em estudo feito com  $\alpha$ -galactosidase de *Aspergillus oryzae*, que o álcool *t*-butanol induziu uma taxa de recuperação de 92%, enquanto que *n*-propanol e isopropanol apresentaram valores abaixo de 40%. Os autores ainda afirmaram que por sua estrutura química ser ramificada, o solvente *t*-butanol não consegue penetrar a estrutura globular da proteína, e assim, evitando a desnaturação.

Além do mais, termodinamicamente falando, o *t*-butanol atua como um agente cosmotrópico, ou seja, que tem a capacidade de favorecer uma maior interação hidrofóbica na proteína, possibilitando ao mesmo tempo, a ruptura de interações entre esta macromolécula e a água. Em conformidade a estes resultados, destaca-se também, o trabalho elaborado por Ketnawa et al., (2014) em que afirmaram computar maior taxa de recuperação na purificação de proteases induzidas pelo solvente *t*-butanol, quando comparado com o 1-butanol, 1-propanol e 2-propanol.

Na Figura 39 tem-se o SDS-PAGE, em que diferenciamos o perfil de proteínas obtido por meio da precipitação induzida pelos solventes orgânicos

(etanol e acetona) e, por intermédio do sistema TPP. De modo claro, observa-se na imagem que as amostras advindas da precipitação com acetona e etanol apresentaram, entre os dois géis (superior e inferior), uma coloração mais escura, bastante característica de proteínas. Por outro lado, não é visualizado na proveniente do sistema TPP (quadro vermelho). Sabemos que esta técnica não nos permite uma detalhada informação quantitativa, sobre as proteínas existentes em cada extrato, nem nos favorece a identificação estrutural de cada uma delas. Sobretudo, podemos perceber que dentre as três amostras analisadas, o sistema trifásico foi o único que apresentou maior resolução, bem como não resultou sinais de obstrução por parte de aglomerados supramoleculares.

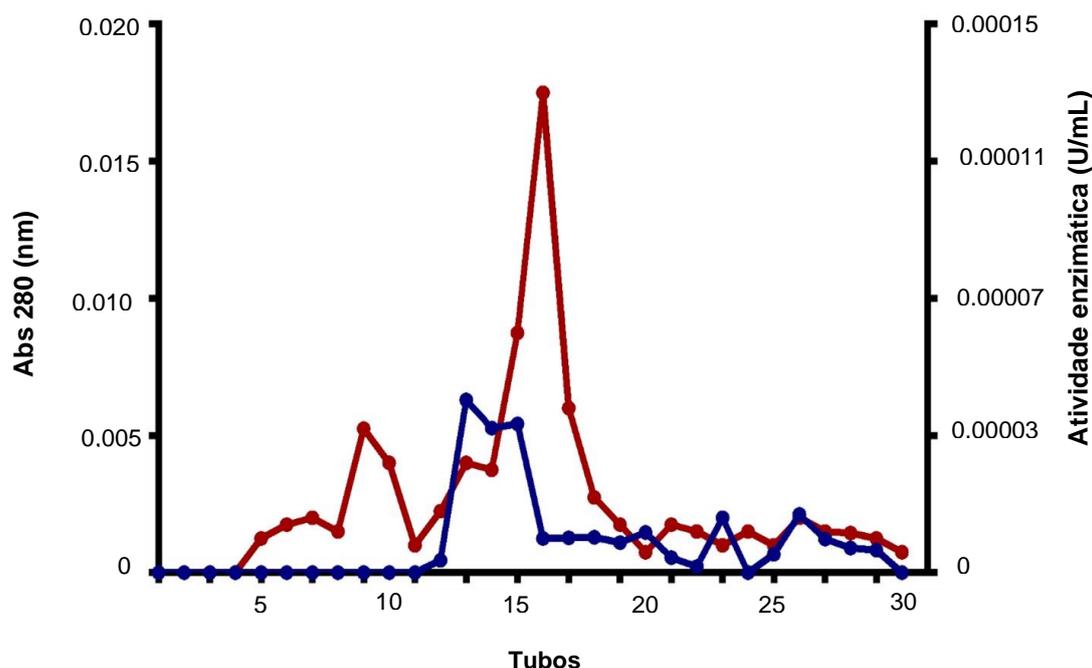
Figura 39: SDS-PAGE. Análise comparativa dos solventes orgânicos na precipitação de proteínas: Canaleta 1: Acetona; canaleta 2: Etanol; canaleta 4: Sistema TPP. A eletroforese foi processada a voltagem constante (90 mV), e as bandas foram coradas com Coomassie.



Fonte: elaborada pelo autor, 2020

Diante do resultado, foi decidido submeter esse material (TPP) à cromatografia líquida com a coluna cromatográfica S-100 Sephacril e, corroborá-la com a inicialmente executada, onde fora constatado a primeira obstrução da resina (Figura 40).

Figura 40: Cromatograma S-100 Sephacryl, pós-TPP



Fonte: elaborada pelo autor, 2020

Através da figura, podemos perceber que a cromatografia desempenhou um comportamento semelhante ao observado no primeiro experimento e, que o momento de eluição foi o mesmo (tubos 15, 16 e 17); sendo que neste, todo o transcorrer cromatográfico se manteve inalterado, de forma que o equipamento Akta não apresentou perturbações em sua pressão, confirmando por meio deste resultado, que o método foi de precisa utilidade, visto ter possibilitado a purificação enzimática, sem o comprometimento dos equipamentos utilizados. Todo processo de purificação da protease sérica extraída das sementes de *C. stipularia* é devidamente apresentado na Tabela 6.

Tabela 6: Resumo da purificação da serinoprotease a partir das sementes verdes de *C. stipularia*. Para o cálculo de atividade foi tomado a seguinte equação:  $U=(A_{410}/\text{min})\times 10^6 \times (1/8800 \times \text{mL})$ ,  $8800\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$

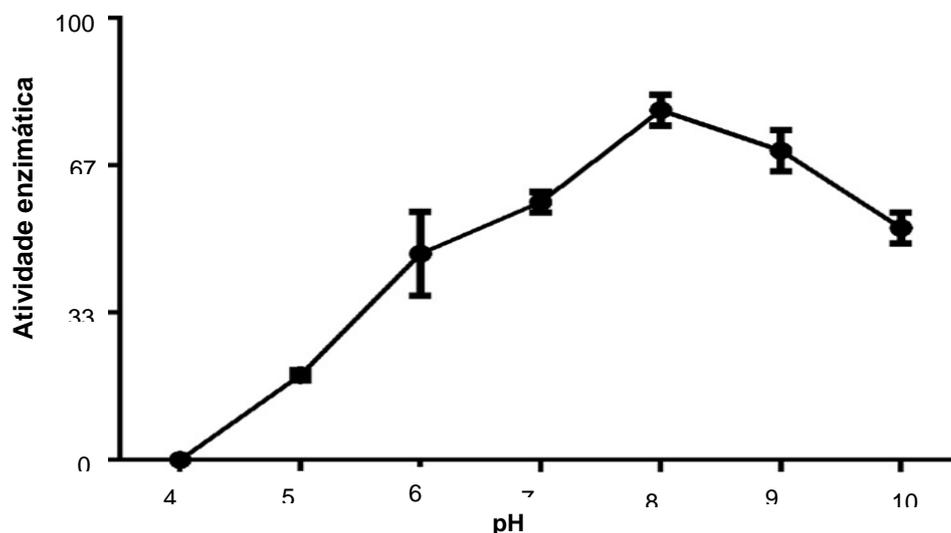
Etapas de purificação	Atividade total (U)	Proteína total (mg)	Atividade específica (U/mg)	Recuperação (%)
Extrato bruto	190	5,229	36,335	100
TPP	130	1,358	95,729	68%
S-100 Sephacril	90	0,028	3.214,285	47%

Fonte: elaborada pelo autor, 2020

## 5.9 pH Ótimo e Temperatura Ótima

Posterior a esses resultados, avaliou-se o perfil cinético da enzima, analisando a sua catálise de reação em diferentes valores de pH e temperatura (Figura 41 e 42).

Figura 41: pH ótimo da protease isolada das sementes de *C. stipularia*: Curva de pH ótimo



Fonte: elaborada pelo autor, 2020

Na Figura 65, verifica-se que em pH 4,0 e 5,0 não houve atividade expressiva para a hidrolase purificada. Tal fato pode ser atribuído a provável desnaturação da molécula em meio ácido. A desnaturação enzimática é o termo usado para qualquer alteração estrutural desencadeada na enzima, a qual impede que a molécula realize sua função catalítica anteriormente executada.

Conforme discutido em seções anteriores, a atividade de serino proteases tem como característica a participação da tríade catalítica dos seguintes aminoácidos: serina, histidina e o ácido aspártico. Uma das etapas primordiais no mecanismo catalítico está associado à ação do aminoácido histidina como uma base de Lewis, abstraindo o próton do resíduo de serina. Assim, em condições ácidas (pHs 4,0 e 5,0) o resíduo de histidina se porta na sua forma protonada, impossibilitando assim o ataque nucleofílico ao próton ligado a hidroxila da serina e, conseqüentemente inibindo a reação de hidrólise. Resultados semelhantes foram reportados por Yadav, Pande e Jagannadham et al., (2006) ao isolarem serino protease de *Euphorbia milii*, e Tomar et al., (2008) quando purificaram serino protease de *Wrightia tinctoria*.

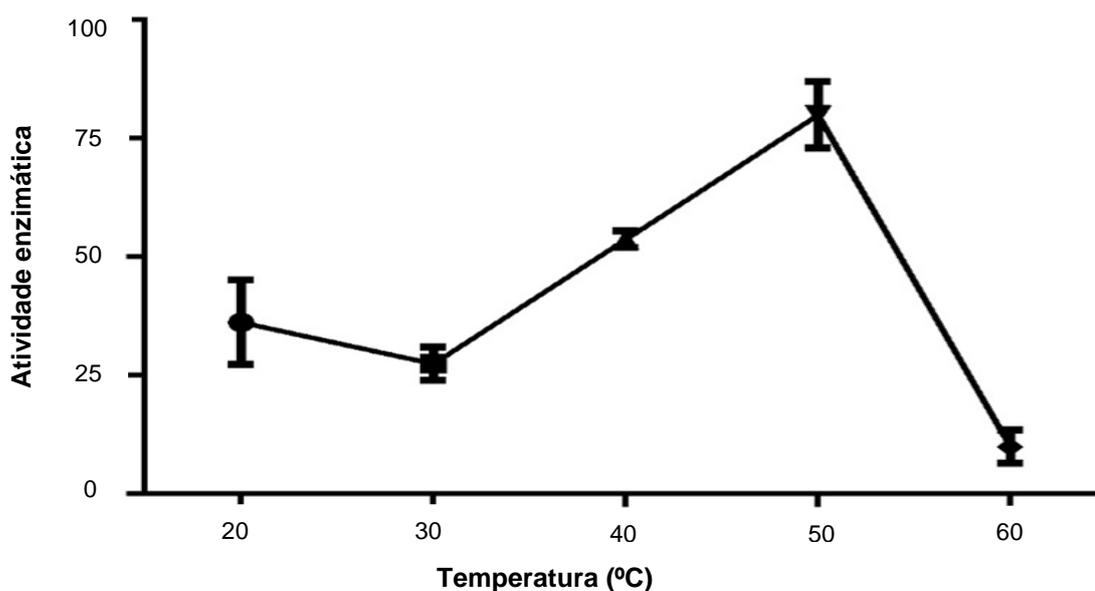
Todavia, entre os valores (6,0-8,0), constatam-se altos níveis de catálise, sendo que o maior deles, correspondente ao pH ótimo, foi em pH 8,0. Este efeito é

também facilmente compreendido pelo estudo mecanístico da tríade catalítica, uma vez que a partir do pH 6,0 o resíduo de histidina começa a sofrer a desprotonação do hidrogênio ligado ao nitrogênio interno do anel ( $pK_R$  da histidina é 6,0). Em continuidade, ao passo que o pH foi elevado para 9, a atividade enzimática é atenuada, corroborando assim mais uma ação desnaturante desencadeada pelo pH, desta vez em condições alcalinas.

Enquanto que nos pHs 4,0 e 5,0 o aminoácido mais atuante no comportamento inibitório da tripsina era o resíduo de histidina, no meio básico, verifica-se a alteração estrutural em praticamente todos os resíduos da tríade, assim como os outros que compõem a proteína, pois nestas condições, boa parte dos grupos ionizáveis começam a ser dissociados, em virtude do excesso de cargas negativas distribuídas ao longo da macromolécula (KHANGEMBAM e CHAKRABARTI, 2015).

Assim como o pH foi preponderante no desempenho mecanístico da protease sérica isolada a partir das sementes de *C. stipularia*, a temperatura também possibilitou diferentes efeitos, tanto no beneficiamento, como para a depleção da estrutura nativa. O experimento foi realizado mediante a variação da temperatura de 20-60°C, em que se constatou a maior processabilidade do substrato a 50°C (Figura 42).

Figura 42: temperatura ótima da protease isolada das sementes de *C. stipularia*: Curva de temperatura ótima



Fonte: elaborada pelo autor, 2020

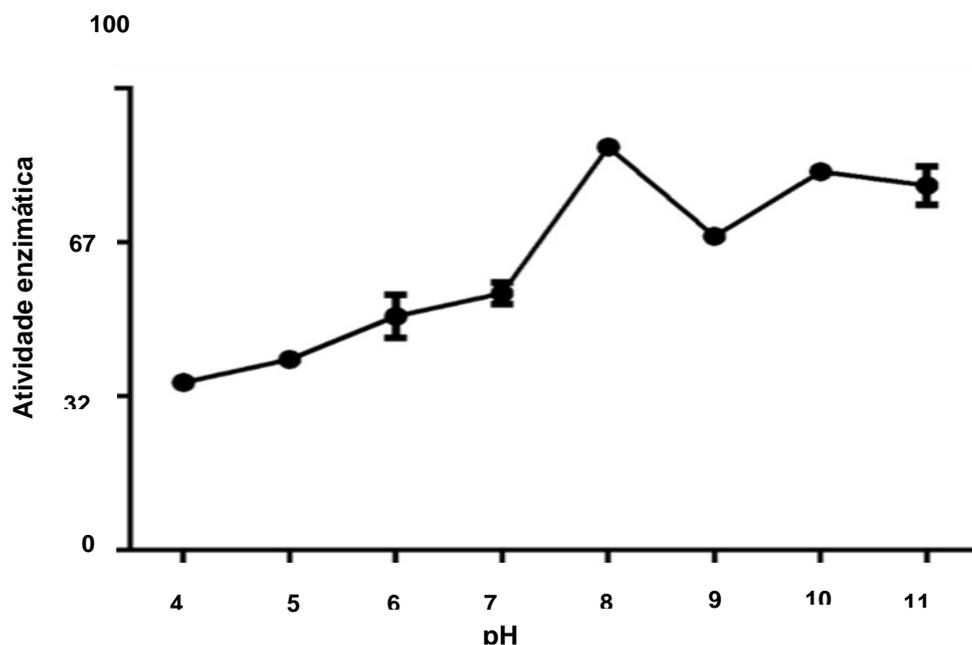
Isto, por sua vez, está diretamente relacionado ao grau de liberdade de todos os átomos existentes na estrutura proteica. Aqui, não há a constatação de dissociação de espécies químicas, conforme visualizado no estudo de pH, mas apenas ao nível de agitação estrutural que a proteína se encontra

Ao passo que se eleva a temperatura, o estado cinético dos átomos aumenta, ocasionando vibrações e rotações desproporcionais ao longo das ligações covalentes, e em decorrência, possibilita o afastamento de átomos, ou mesmo a aproximação indesejada dos mesmos. Em ambos os casos, a molécula perde a sua conformação nativa, atingindo níveis energeticamente desfavoráveis e, como resultado, alterando a reação anteriormente desempenhada.

Ao confrontar os nossos resultados com outras hidrolases séricas, vemos uma ligeira distinção, quanto a temperatura ótima, o que provavelmente, pode estar associado a incidência de pontes de sulfeto na cadeia polipeptídica, ou mesmo, a ocorrência de glicídios associados ao esqueleto carbônico. Ahmed et al., (2009) por exemplo, isolaram uma serino proteases com temperatura ótima em 60-70°C; Tomar et al.,(2008) purificaram uma serino protease com atividade máxima em 80 °C; e Pande (2006) reportam em seus estudos, atividade ótima para Criptolepaína isolada de *Cryptolepis buchanani* em 70°C.

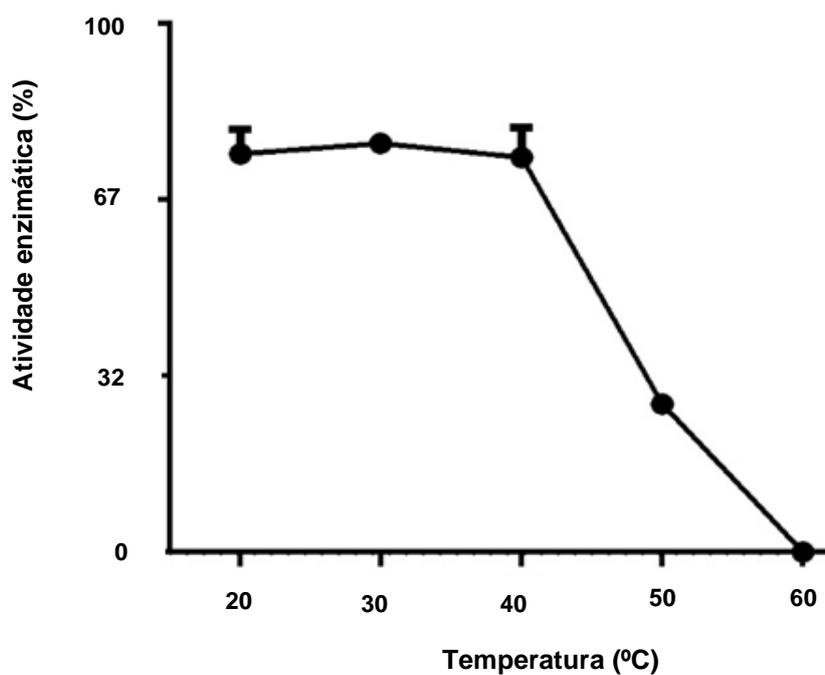
### **5.10 Estabilidade em pH e Estabilidade Térmica**

Na Figura 43 mostra-se a estabilidade da serino protease purificada a partir das sementes de *C. stipularia* mediante a variação do pH. Como é mostrado na figura, a enzima se manteve estável em condições alcalinas. Semelhantes a estes resultados, destacam-se a purificação de serino protease das sementes de *Solanum dubium* (AHMED et al., 2009) e, de *Cucumis trigonus*; em que puderam verificar a similaridade cinética desta molécula mediante a estabilidade em pHs superiores à neutralidade (ASIF-ULLAH, KIM e YU, 2006).

Figura 43: estabilidade em pH da protease isolada a partir das sementes de *C. stipularia*

Fonte: elaborada pelo autor, 2020

Posteriormente, foi determinado o comportamento cinético da protease em diferentes temperaturas; sobretudo, na sua capacidade em estabilizar a estrutura tridimensional (Figura 44).

Figura 44: estabilidade térmica da protease isolada a partir das sementes de *C. stipularia*

Fonte: elaborada pelo autor, 2020

Observe que a hidrolase purificada não revelou forte estabilidade quando submetida a aquecimento, o que provavelmente deve estar associado à ausência, ou menor incidência de grupos dissulfeto oxidados, os quais favorecem uma maior estabilidade térmica.

Normalmente, as proteases séricas se mostram estável até 60°C, como as enzimas purificadas de *Cryptolepis Buchanani* (PANDE et al., 2006); *Ficus religiosa* (KUMARI, et al., 2010); *Solanum dubium* (AHMED et al., 2009) e *Tamarillin* (LI et al., 2018). Entretanto, é importante salientar que nesses casos, a atividade enzimática foi avaliada por técnicas diferentes das efetuadas em nossa pesquisa, em que as atividades proteolíticas eram menos específicas, ao usarem complexos proteicos como albumina, caseína e, outros. Por outro lado, a metodologia proposta para a protease sérica isolada a partir das sementes de *C. stipularia* foi realizada por ensaio cromogênico, através da avaliação da hidrólise do substrato BApNA

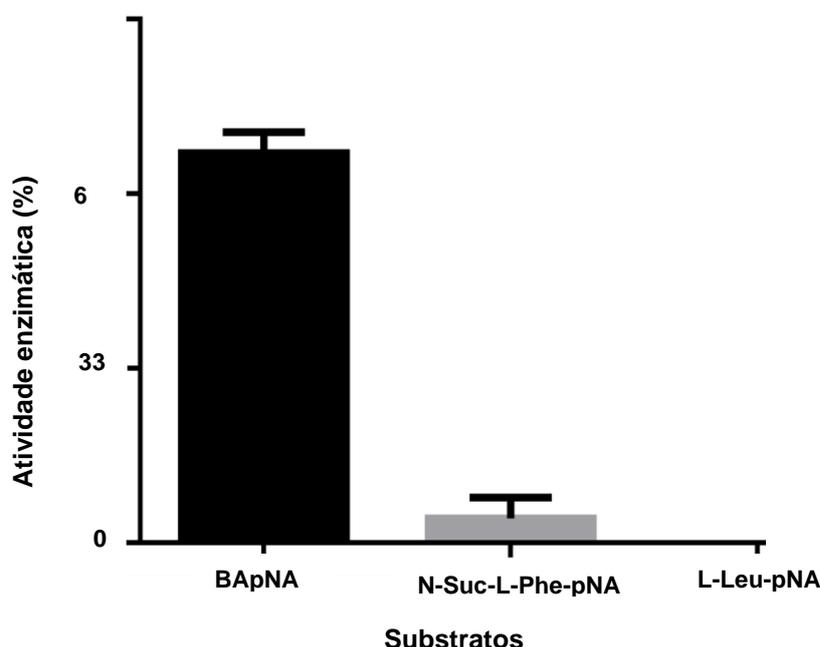
#### **5.11 Especificidade da serino protease isolada de *C. stipularia* para substratos sintéticos conjugados com p-nitroanilina (p-NA)**

As reações enzimáticas são imprescindíveis a manutenção da vida de qualquer ser vivo e, em se tratando de atividade bioprocessual, constatamos que o uso crescente de enzimas na atividade biotecnológica se deve a algumas peculiaridades, como a especificidade entre as enzimas e seus substratos (DE SOUSA et al., 2013). É graças a esta seletividade que conseguimos também realizar a classificação bioquímica das enzimas que estamos isolando, tendo em vista que essa propriedade leva em consideração o comportamento de catálise proporcional à tríade catalítica que a enzima possui.

Desta forma, com a finalidade de confirmarmos a verdadeira classificação da enzima isolada a partir das sementes de *C. stipularia*, realizou-se uma atividade enzimática comparativa com diferentes substratos peptídicos sintéticos conjugados com p-nitroanilina p-NA (ALICI e ARABACI, 2018) (Figura 45).

Dentre os três substratos sintéticos testados, a enzima isolada de *C. stipularia* mostrou seletividade catalítica apenas para o BApNA (N $\alpha$ -Benzoyl-DL-Arg-pNA) o que revela que a enzima obtida é de fato, pertencente a classe das serino proteases do tipo tripsina-símile, visto ter apresentado especificidade única pelo resíduo de arginina. Por outro lado, para os demais substratos sintéticos N-Suc-L-Phe-pNA e L-Leu-pNA a enzima se mostrou inerte.

Figura 45: Especificidade da protease isolada de *C. stipularia*: As reações foram efetuadas em pH 8,0 em que a enzima purificada foi submetida à incubação com os respectivos substratos.



Fonte: elaborada pelo autor, 2020

Ao confrontarmos os nossos resultados com demais pesquisas associadas, vemos que o nosso apresenta uma singular especificidade para um único substrato sintético, ao passo que demais trabalhos revelam a processabilidade de mais de uma molécula. Como exemplo, destacam-se a purificação de uma protease do morango, em que revelou alta taxa de hidrólise para os substratos  $\text{N}\alpha$ -Benzoyl-DL-Arg-pNA, N-Suc-L-Phe-pNA e L-Leu-pNA (ALICI e ARABACI, 2018); Singh et al (2010) relataram que uma serino protease, Crinum, mostrou atividade para N-Suc-L-Phe-pNA e L-Leu-pNA, mas não apresentou atividade para Na-Benzoil-DL-Arg-pNA e N-Suc-Ala-Ala-Ala-pNA.

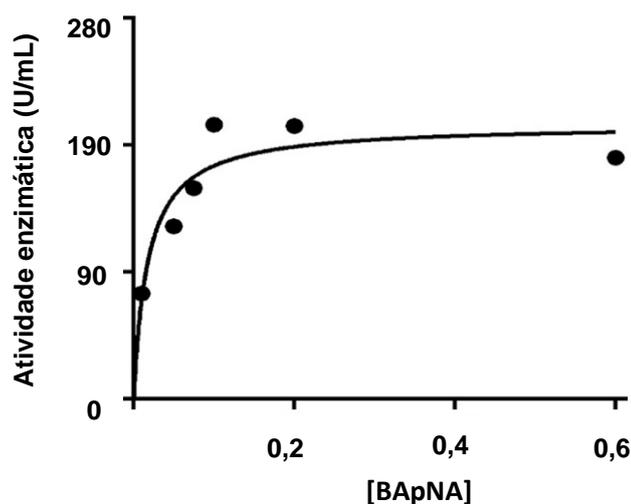
Por fim, cita-se a protease sérica, Wrightin, que não mostrou atividade amidolítica em relação aos substratos N-Suc-L-Phe-pNA, Na-Benzoil-DL-Arg-pNA e L-LeupNA, preferenciando a hidrólise apenas nos resíduos-Ala (TOMAR, KUMAR, e JAGANNADHAM, 2008).

### 5.12 Estudos Cinéticos

Outra importante estratégia na determinação da eficiência catalítica de uma enzima é a sua velocidade de reação, bem como a forma como essa é perturbada

mediante variações na concentração do substrato. O efeito da concentração do substrato BApNA na velocidade da reação catalisada pela protease isolada das sementes de *C. stipularia* foi determinado pelo modelo cinético de Michaelis-Menten (Figura 46).

Figura 46: Gráfico de Michaelis–Menten para a protease isolada de *C. stipularia*: Para o ensaio foram usadas diferentes concentrações do substrato BAPNA (0,01–0,6 mM); concentração da enzima: 0,028 mg/mL.



Fonte: elaborada pelo autor, 2020

Através do experimento podemos verificar que o comportamento da enzima mostra uma clássica curva hiperbólica, isto, por sua vez, após ser submetida à reação com diferentes concentrações do substrato sintético. Além disso, foi possível determinar a expressiva especificidade da molécula pelo substrato, uma vez que apresentou um valor de  $K_m$  de apenas 0,01775 mg/mL, e um  $V_{max}$  de 0,1082 mM/min. Shamsi et al. (2017) em estudo realizado com *Cicer Arientum* alcançaram a purificação de uma enzima sérica que apresentou constantes  $V_{max}$  de 0,153 mM/min e  $K_m$  de 0,192 mM (SHAMSI et al., 2017), confirmando assim, uma maior especificidade da protease sérica isolada das sementes de *C. stipularia*, quando submetida a reação com o substrato sintético BApNA.

Por meio destes resultados, foi também possível determinar uma terceira constante cinética ( $K_{cat}$ ) cujo valor obtido para a serino protease purificada foi de 3,86 s<sup>-1</sup>. Tal valor foi superior ao encontrado com a tripsina purificada de *Cicer arientum* (0,306 s<sup>-1</sup>) o que nos leva a concluir que a protease extraída das sementes de *C. stipularia* apresenta maior processabilidade pelo substrato, quando confrontada com a obtida no trabalho de Shamsi et al., (2017).

O  $k_{cat}$  é normalmente associado a condições de elevada concentração de substrato, em comparação à concentração enzimática, de forma que dificilmente se conseguiria obter esse perfil em condições fisiológicas. Assim, como estratégia comparativa da efetividade reacional em ambientes fisiológicos, foi criada a expressão  $k_{cat}/K_m$  (constante de eficiência catalítica), onde a velocidade de hidrólise, por exemplo, está diretamente relacionada à concentração das duas únicas espécies envolvidas [enzima] e [substrato]. Shamsi et al verificaram o valor da constante de especificidade de 1,59 (SHAMSI et al., 2017) ao passo que os nossos resultados, apresentaram constante de 217,46.

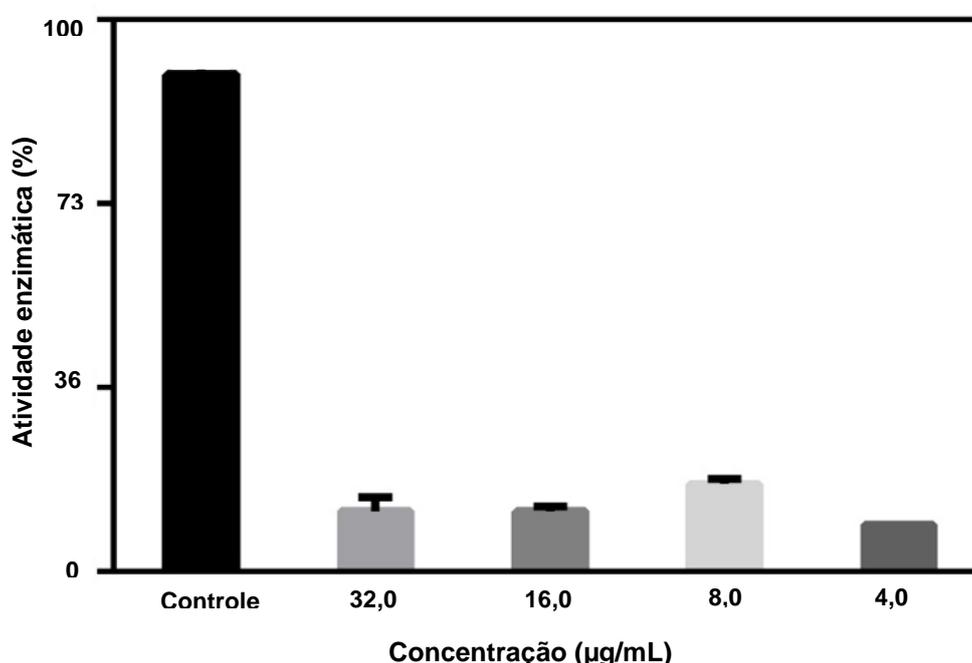
# SEÇÃO II

*(C. plumieri)*

### 5.13 Efeito da Concentração do Extrato de *C. plumieri* na Atividade Inibitória

Posteriormente a certificação taxonômica da planta, realizou-se a extração do material biológico (Sementes) e, após obtenção do EB, executamos os ensaios bioquímicos, para certificação da presença de inibidor de tripsina. Em seguida, realizou-se uma análise quantitativa, acerca do efeito da concentração do EB na hidrólise do substrato BApNA, promovido pela enzima tripsina bovina comercial. (Figura 47).

Figura 47: Atividade inibitória do extrato bruto de *C. plumieri*: efeito da concentração



Fonte: elaborada pelo autor, 2020

A análise detalhada da figura nos mostra que o extrato preparado com as sementes de *C. plumieri* apresentou forte atividade inibitória com a enzima estudada e, por sua vez, assumiu elevada especificidade pela tripsina. Observe que mesmo em menores concentrações, correspondente ao menor volume do extrato, a conversão do BApNA foi inibida quase que por completo.

Em conformidade com estes resultados, podemos destacar o trabalho reportado por Mohanraj et al., (2018) ao isolarem um inibidor de tripsina a partir das sementes de *Rhynchosia sublobata*. Os pesquisadores ainda retrataram que de modo majoritário, os inibidores de proteases isolados de espécies vegetais assumem uma estrutura tridimensionalmente globular e, são normalmente

sintetizados em órgãos de armazenamento, como as sementes e tubérculos. Não obstante, em virtude de sua funcionalidade metabólica, eles podem ainda ser induzidos em órgãos vegetativos de plantas durante estresse biótico e abiótico.

Ainda na Figura 71 é possível observar que mesmo com as menores concentrações (4,0µg/mL), a conversão enzimática do substrato sintético BApNA foi inibida quase que por completo, o que nos leva a interpretação de que para a classe de enzima testada (tripsina bovina) o inibidor encontrado no extrato bruto apresentou forte especificidade.

Reportando o trabalho de Mohanraj et al., (2018) tem-se que a atividade residual do extrato de *C. cajan* revelou inibição completa (100%) na atividade hidrolítica da tripsina; entretanto, para este resultado, os pesquisadores tiveram que aplicar uma concentração proteica do extrato em pelo menos 80µg/mL, ao passo que em nossa pesquisa, com a concentração de proteína 20 vezes menor, obtivemos uma inibição residual relativamente equiparada. Como fora discutido anteriormente, a associação do inibidor com a enzima é categorizada pela intrínseca complementaridade entre as duas moléculas, sendo assim, quanto maior a interação firmada entre elas, mais efetiva será a inibição.

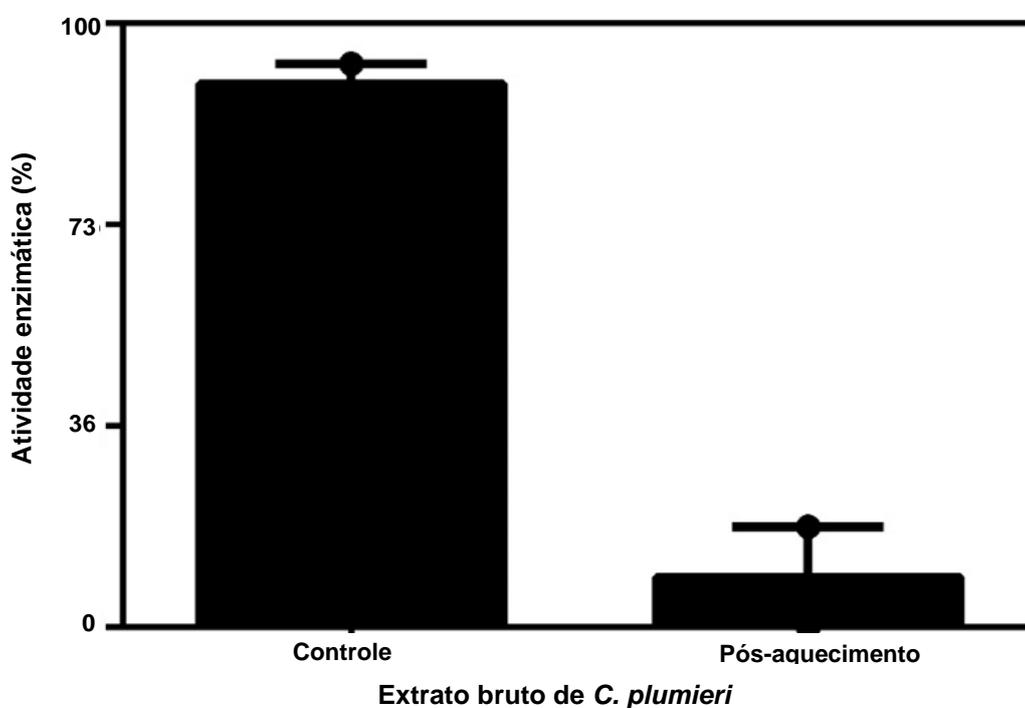
Em virtude da ampla aplicabilidade biotecnológica para os inibidores de tripsina, bem como a grande incidência de sua presença em espécies vegetais, muitos são os trabalhos encontrados na literatura que mostram a purificação de proteínas inibitórias a partir de espécies vegetais, como Pandey e Jamal (2014) em trabalho com *Tamarindus indica*; Dias et al., (2017) ao trabalharem com as sementes de *Cassia leiandra*, e Rasouli et al., (2017) ao reportarem a purificação de inibidor de tripsina das sementes de *Cucumis melo*.

#### **5.14 Efeito da Temperatura na Atividade Inibitória do Extrato de *C. plumieri***

Por se tratar de um material de grande complexidade molecular, podemos inferir que a ação inibitória encontrada no extrato das sementes de *C. plumieri* poderia decorrer da participação singular de metabólitos primários, ou secundário, bem como por ação sinérgica de um complexo supramolecular. Sendo assim, realizou-se um ensaio térmico, como forma de averiguar a estabilidade do inibidor e, com isso, confrontar os resultados obtidos com demais reportados na literatura.

Através da Figura 47, podemos inferir que mesmo diante do aquecimento, a inibição residual da tripsina bovina se manteve inalterada (aproximadamente 90%) quando a comparamos com a taxa de inibição verificada no experimento anterior, o que revela uma importante característica estrutural da molécula, que seria a sua integridade estrutural mediante aquecimento. Normalmente, os polipeptídios que apresentam esse comportamento termodinâmico possuem em sua estrutura primária várias ligações dissulfeto (S-S), as quais internalizam a estas moléculas maiores estabilidades estruturais (CHEVREUIL, et al., 2014).

Figura 48: Atividade inibitória do extrato bruto de *C. plumieri*, efeito da temperatura



Fonte: elaborada pelo autor, 2020

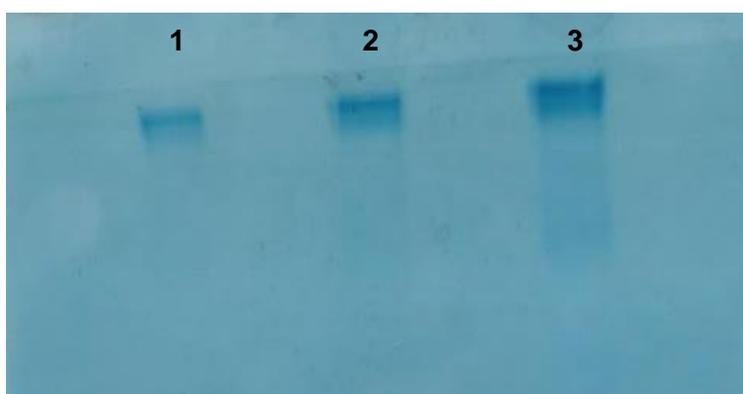
Esse tipo de comportamento cinético mostra ser relativamente comum para inibidores de tripsina de cadeia polipeptídica. Dias et al., (2017) em estudos realizados com as sementes de *Cassia leiandra*, reportaram que de forma natural, os inibidores de tripsina do tipo Kunits, quando expostos a alta temperatura assumem forte estabilidade. Tais resultados, assemelham-se aos observados por Guimarães et al., (2015) com o inibidor de tripsina purificado das sementes de *Poincianella pyramidalis*; De Souza et al., (2016) ao purificarem um inibidor de tripsina das sementes de *Adenathera pavonina L.* observaram atividade inibitória

após incubação em ampla faixa de temperatura, durante 30 min. Como destaque, frisa-se também a pesquisa realizada com o inibidor tipo Kunits obtido das sementes de *Pithecellobium dumosum*, em que mantiveram 90% de sua atividade inibitória, após 30 min de incubação, variando-se a temperatura de 37-100°C (RUFINO et al., 2013). Ainda nesta perspectiva, vale salientar que os inibidores de proteases do tipo Kunits são relatados em diferentes famílias botânicas, como *Caricaceae* (AZARKAN, et al., 2006), *Solanaceae* (VALUEVA et al., 1998), *Euphorbiaceae* (CLAUDHARY et al., 2008), e em maior incidência, em sementes de *Fabaceae* (PANDO et al., 2001).

### 5.15 Zimografia Reversa com o Extrato de *C. plumieri*

Embora existam trabalhos na literatura enfatizando a estabilidade térmica de alguns inibidores de tripsina, decidiu-se consolidar essa informação por meio de uma zimografia reversa, em que por intermédio de um suporte sólido, avaliamos se a inibição observada no extrato de *C. plumieri* provinha de molécula proteica, ou de outra estrutura orgânica (metabólito secundário) (Figura 49).

Figura 49: Zimografia reversa do extrato de *C. plumieri*: na canaleta 1, o extrato vegetal das sementes de *C. plumieri*, na concentração de 0,0025mg/mL; na canaleta 2, o extrato na concentração de 0,005mg/mL; e na canaleta 3, o extrato com 0,01mg/mL de concentração



Fonte: elaborada pelo autor, 2020

Durante o experimento, tomou-se o cuidado de não submeter as amostras a aquecimento, nem a agentes redutores, de forma que as proteínas existentes nos extratos estivessem em condições íntegras e, assim, não interferindo a sua atividade inibitória. Toda a eletroforese foi processada à voltagem constante e, após

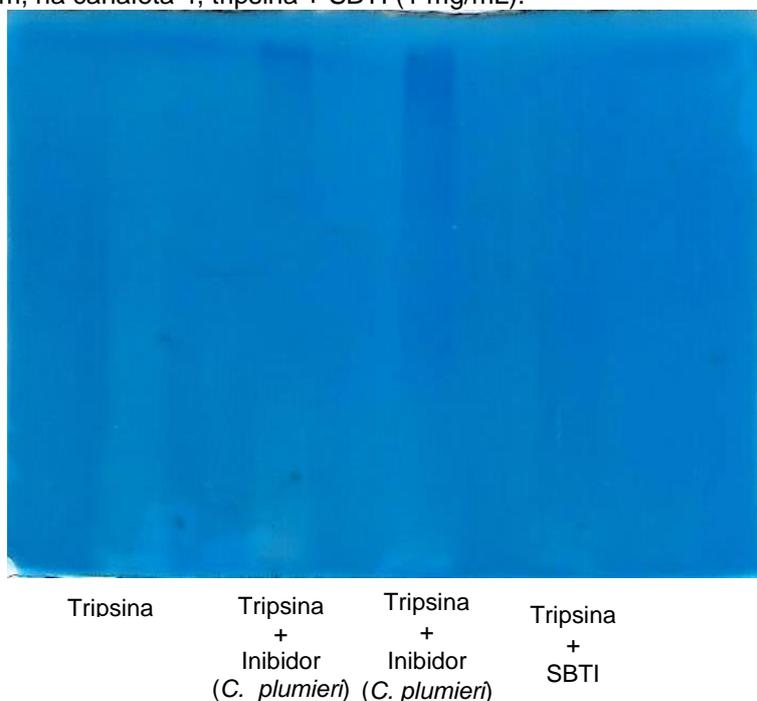
execução experimental, o gel foi mantido em incubação, com uma solução de tripsina.

Através do experimento, percebe-se que apenas nas regiões onde a proteína com atividade inibitória foi eluída, na eletroforese, é que não se visualizou a hidrólise da tripsina, ao passo que nas demais regiões do gel, toda a caseína fora hidrolisada, assim como outras proteínas também existentes no extrato. Com isso, conseguimos validar a hipótese de que a inibição de tripsina identificada no extrato da *C. plumieri* é sim provocada pela associação complementar da hidrolase com um inibidor proteico existente no extrato.

### 5.16 Ensaio Inibitório em Fase Sólida com o Extrato de *C. plumieri*

Arelado a zimografia reversa, realizou-se um ensaio inibitório do extrato vegetal com a tripsina polimerizada no gel, conforme especificado no item 4.3.8. Para esta análise, tomamos como referência a tripsina aplicada na eletroforese; sobretudo, no efeito inibitório do extrato da *C. plumieri* contraposto ao SBTI (inibidor clássico de Serinoproteases). (Figura 50).

Figura 50: ensaio inibitório em fase sólida com o extrato de *C. plumieri*: da esquerda para direita tem-se na canaleta 1 a enzima tripsina bovina; na canaleta 2, tripsina bovina + inibidor (*C. plumieri*), na concentração de 0,005 mg/mL; na canaleta 3, tripsina + inibidor (*C. plumieri*), na concentração 0,01 mg/mL; e por fim, na canaleta 4, tripsina + SBTI (1 mg/mL).



Semelhantemente ao mostrado na seção anterior, tem-se que as amostras não foram submetidas a aquecimento, bem como submissão a agentes redutores. Todo o procedimento experimental foi realizado mediante voltagem constante. Antes de a tripsina ser aplicada na eletroforese, seguido de suas misturas, tomou-se o cuidado de incubar a molécula por 15 min com os respectivos inibidores.

Conforme especificado na figura, vemos na canaleta 1, a hidrólise da caseína promovido pela tripsina, através da menor intensidade na coloração. Por outro lado, nas demais canaletas, onde se aplicou os extratos da planta em diferentes concentrações, percebe-se que a hidrólise citada anteriormente não mais ocorre, semelhante ao verificado com o inibidor SBTI. Resultados equivalentes também foram reportados por Dias et al., (2017), mediante atividade inibitória imposta às proteases digestivas do *A. aegypti*.

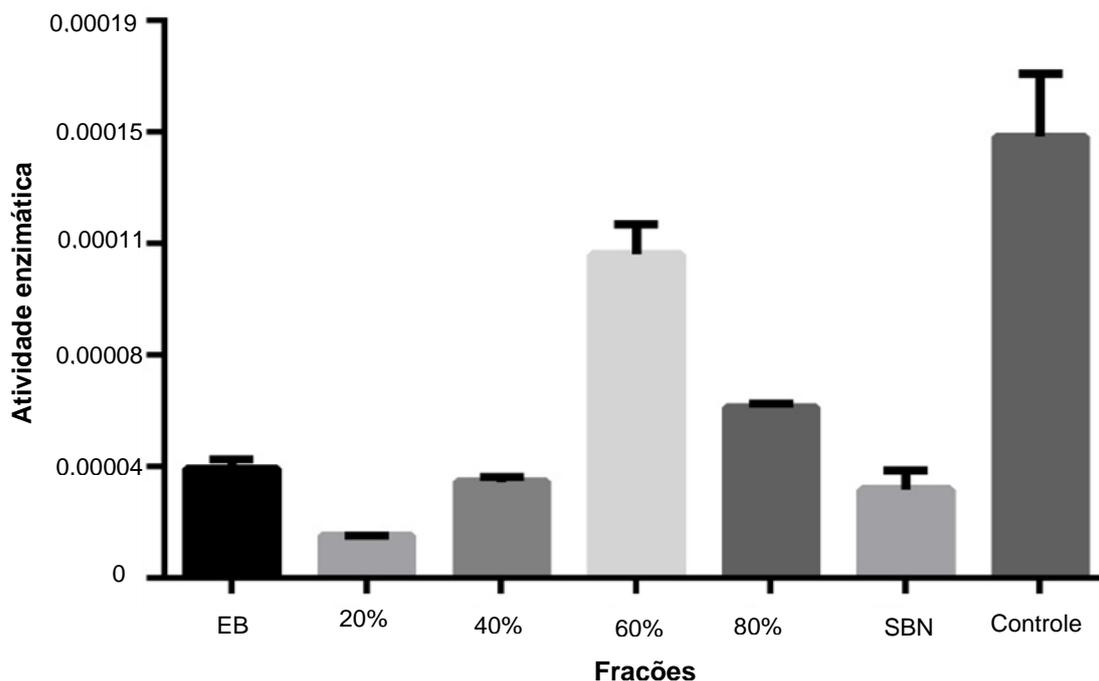
### **5.17 Precipitação com Sulfato de Amônio a Partir do Extrato de *C. plumieri***

Após confirmação da presença do inibidor proteico, a amostra foi submetida a um prévio tratamento (precipitação salina) visando a extração de demais proteínas contaminantes, elevando com isso, o grau de pureza da amostra. Diante das possibilidades mencionadas na literatura, conforme visto anteriormente, adotou-se para essa pesquisa, o sulfato de amônio, reagente químico amplamente utilizado em trabalhos voltados a purificação de inibidores de tripsina, a exemplo de Pandey e Jamal (2014) quando purificaram inibidor de tripsina das sementes de *Tamarindus indica*; Rasouli et al., (2017) ao purificarem inibidor de tripsina das sementes de *Cucumis Melo* e; Palayam et al., (2018) em trabalho feito com as sementes de *Alocasia macrorrhizos*.

A análise detalhada da Figura 51 mostra que a precipitação salina com sulfato de amônio foi efetiva na separação escalonada do inibidor, onde a sua solubilidade mostrou alternância a partir da adição de sal, correspondente a 20% de saturação. Os fatores responsáveis por tamanho comportamento são os mais diversos, principalmente pela composição química dos aminoácidos constituintes (estrutura primária de uma proteína), assim como a sua disposição tridimensional (estrutura terciária).

Embora a utilização do sal tenha favorecido o fracionamento do inibidor em diferentes frações, tem-se que o método utilizado para este estudo apresentou baixa resolução, visto não ter assegurado a concentração da molécula numa só fração.

Figura 51: Precipitação salina com sulfato de amônio do EB da espécie *C. plumieri*



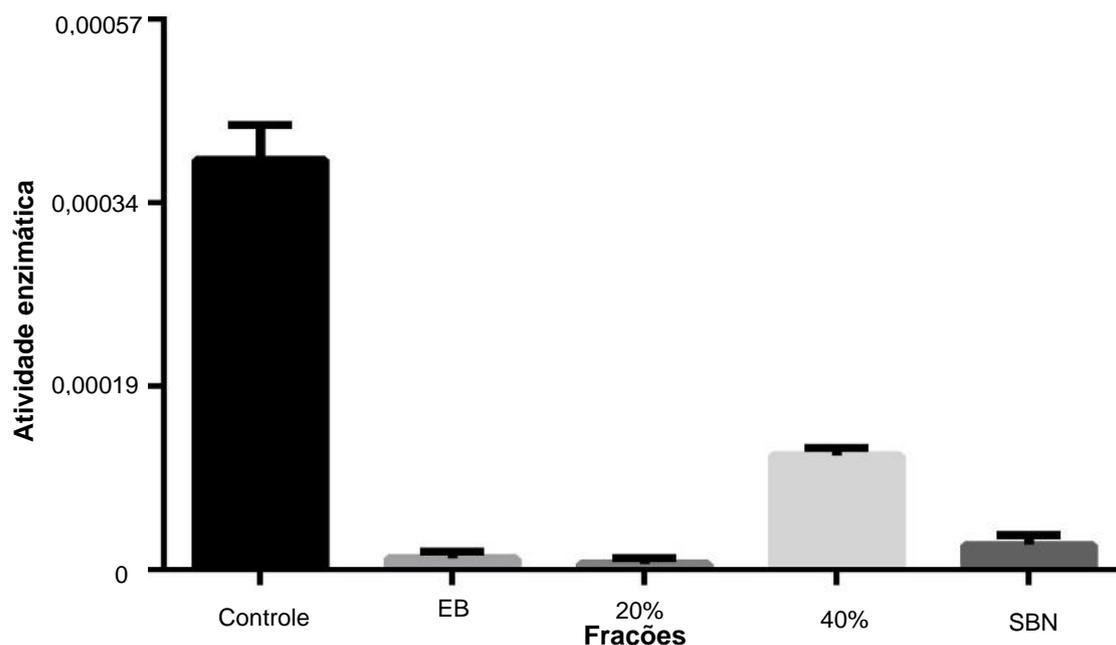
Fonte: elaborada pelo autor, 2020

Desta forma, se fez necessário a realização de uma nova metodologia, cujos resultados obtidos favorecessem uma melhor adequação, quanto aos aqui encontrados. Para este propósito, tomou-se como procedimento metodológico de referência, a precipitação orgânica com etanol, conforme especificado na próxima seção.

### 5.18 Precipitação com Solvente Orgânico (etanol) a Partir do EB de *C. plumieri*

Semelhantemente ao resultado obtido com o sulfato de amônio, a precipitação orgânica mostrou forte eficiência, quanto a capacidade de precipitar o inibidor, sem comprometer a sua estrutura terciária. No entanto, ao avaliarmos o experimento sob a ótica da taxa resolução, percebe-se que a metodologia apresentou baixa especificidade, ao passo que não se manteve concentrada a atividade inibitória numa única fração (Figura 52).

Figura 52: precipitação de proteínas com etanol a partir do EB da espécie *C. plumieri*



Fonte: elaborada pelo autor, 2020

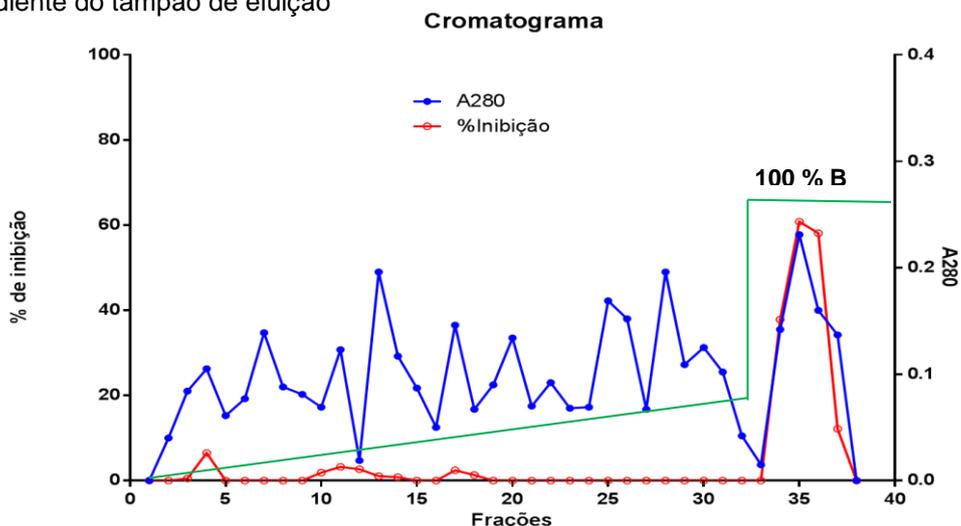
Mediante os resultados obtidos, decidimos aplicar o EB de *C. plumieri* diretamente na coluna cromatográfica DEAE-Sepharose e, então, analisado o perfil de eluição das proteínas; sobretudo, a respeito da efetividade da análise em purificar a molécula estudada.

### 5.19 Cromatografia Líquida com o EB da espécie *C. plumieri*, e SDS-PAGE

Para esse procedimento, foram tomados 2,0mL do extrato das sementes de *C. plumieri*, onde foram aplicados na coluna, através de injeção em loop de igual volume. O método e procedimento cromatográfico seguiu as mesmas especificações proposta por Santos et al., (2016), em que as proteínas eluídas foram monitoradas em tempo real a 280nm. A cromatografia foi operada em gradiente crescente de força salina e, as proteínas separadas de acordo com as suas cargas iônicas. Diferentes dos nossos resultados, Pandey e Jamal (2014) purificaram inibidor de protease por meio das cromatografias: Sephadex-G75, DEAE-Sepharose, Trypsin-Sepharose CL-4B, Guimarães et al., (2015) isolaram inibidor de tripsina partindo de dois processos cromatográficos: Sephadex G-75 e Phenyl Sepharose, e Brandão-Costa, Araújo e Porto (2018) isolaram um inibidor de tripsina com pelo menos dois métodos cromatográficos: Trypsin-Sepharose-CL4B e Superdex-G75.

Ao fim do experimento e monitoramento reacional, verificou-se que o inibidor extraído das sementes de *C. plumieri* foi isolado com a eluição de 100% de tampão B (Figura 53).

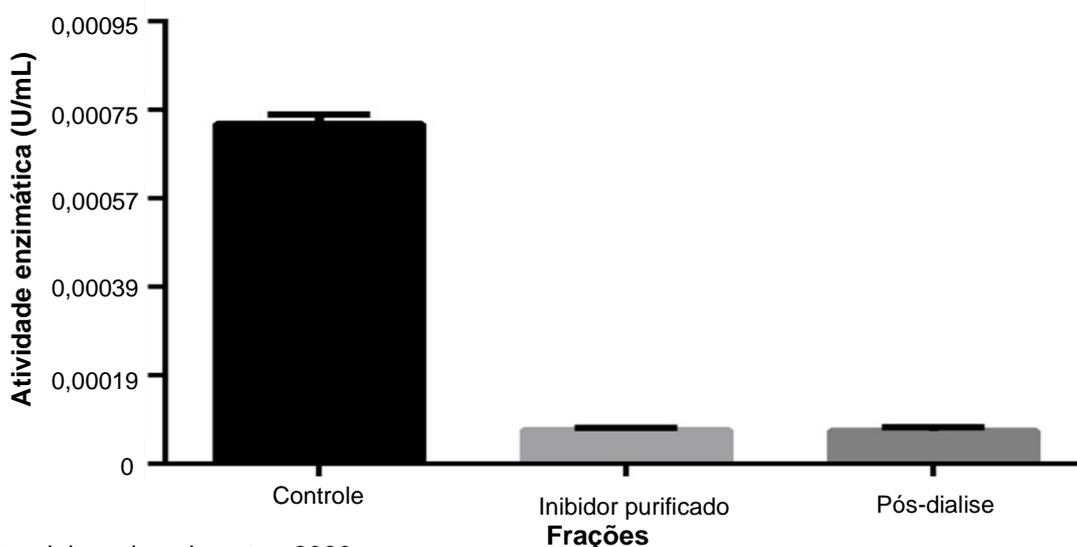
Figura 53: Cromatograma DEAE-Sepharose. No traçado em azul tem-se o perfil de proteínas eluídas, no traçado em vermelho mostra-se a atividade inibitória específica, e no traçado verde, destaca-se o gradiente do tampão de eluição



Fonte: elaborada pelo autor, 2020

Os tubos com maiores atividades inibitórias foram reunidos e dialisados, para a extração do sal usado na cromatografia. Nessa fase do estudo, se torna importante que esse procedimento não interfira a atividade inibitória da molécula, caso contrário, comprometeria o nosso método desenvolvido. Na Figura 54, mostram-se os valores de inibição comparativo da amostra advinda da cromatografia, bem como a atividade remanescente pós-diálise.

Figura 54: Atividade inibitória do extrato bruto de *C. plumieri* pós-diálise

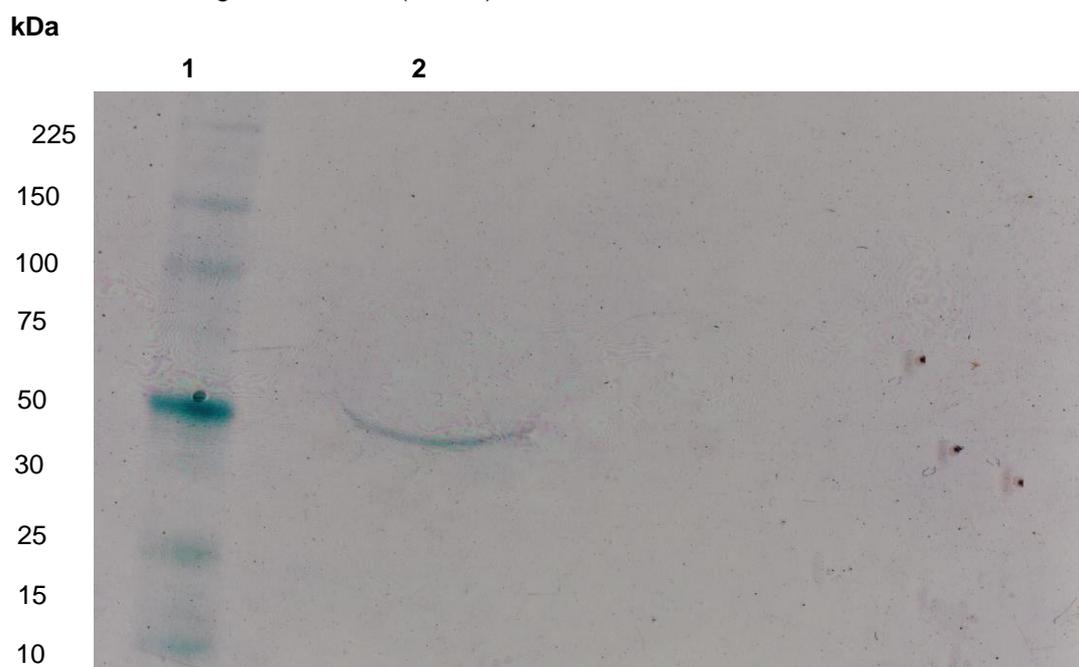


Fonte: elaborada pelo autor, 2020

Por meio da figura, podemos confirmar que a diálise não interferiu na estrutura tridimensional da proteína, de modo que sua ação inibitória se manteve inalterada. Na pretensão de validar o método cromatográfico, realizou-se um estudo eletroforético com o inibidor purificado e, através dele, atribuir a massa estimada por comparação com o padrão de massas de referência

Na canaleta 1 (esquerda para a direita) mostra-se o perfil do padrão de massa molecular aplicado na eletroforese; na canaleta 2, por outro lado, apresenta-se o inibidor pós-diálise, em que é mostrado uma só banda de proteína, confirmando que a metodologia proposta, voltada ao isolamento do inibidor foi efetiva aos fins proposto (Figura 55).

Figura 55 Eletroforese: SDS-PAGE (12%) do inibidor de tripsina purificada a partir das sementes de *C. plumieri*: canaleta 1: Padrão de massa; canaleta 2: Proteína purificada. A eletroforese foi processada a voltagem constante (90 mV), e as bandas foram coradas com Coomassie.



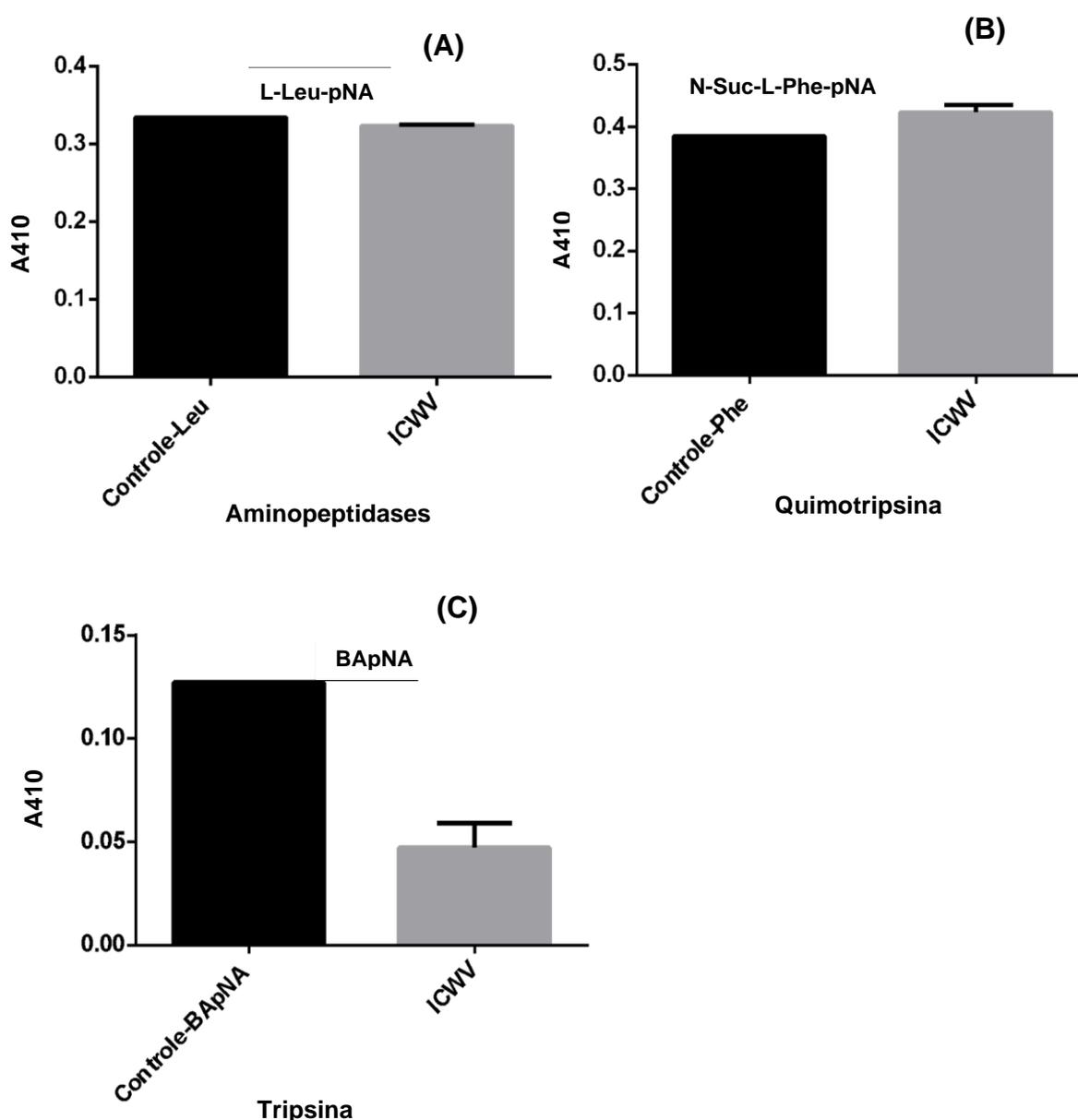
Fonte: elaborada pelo autor, 2020

A partir do padrão de massa molecular, verifica-se que a proteína isolada a partir das sementes de *C. plumieri* possui massa estimada em 50 kDa, valor aproximado ao computado para outros trabalhos já reportados na literatura, como o inibidor purificado de *Vigna radiata L. Wilczek* 47kDa (KANSAL et al., 2008); *hyphantria cunea* 45 kDa (AGHAALI et al., 2013) e *Albizia amara* 49 kDa (DABHADE, MOKASHE e PATIL, 2016)

## 5.20 Teste de Especificidade Inibitória para Diferentes Enzimas Proteolíticas

Após confirmação do isolamento da proteína, realizou-se uma análise de sua especificidade, em que o inibidor foi submetido a reação com diferentes enzimas proteolíticas. Para isso, foram disponibilizados três diferentes substratos conjugados com p-NA (ALICI e ARABACI, 2018) e, monitorado a possível inibição acarretada pela molécula inibitória (Figura 56).

Figura 56: especificidade do inibidor de tripsina purificado a partir das sementes de *C. plumieri*. Análise realizada com três diferentes substratos conjugados com p-NA. (A) L-Leu-pNA; (B) N-Suc-L-Phe-pNa e (C) BApNA.



Fonte: elaborada pelo autor, 2020

Como podemos observar, dentre as três classes de enzimas testadas, a única que apresentou sensibilidade pelo inibidor isolado foi a tripsina, mediante redução da processabilidade do substrato BApNA. É claro que análises mais refinadas são de fundamental importância, na pretensão de identificar a real família que a inibidor isolado está inserido. Assim, submeteu-se a amostra às análises de espectrometria de massas, em colaboração com laboratório externo à Universidade Federal de Alagoas.

## **5.21 Aplicação Biotecnológica para o inibidor de Tripsina Isolado das Sementes de *C. Plumieri***

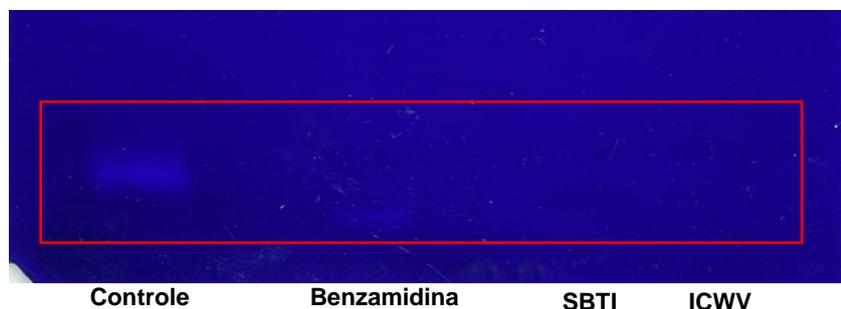
5.29.1 teste de inibição, *in vitro*, contra tripsina-símilis isolada do intestino do inseto praga *T. castaneum*.

Após a certificação da especificidade molecular da proteína isolada, decidimos avaliar a sua utilização como possível combate ao inseto praga *T. castaneum*. A fisiologia deste animal é marcada pela compartimentalização do seu trato digestivo, em que na porção anterior, tem a participação mais expressiva de enzimas ácidas como as enzimas L e B cisteína peptidases (VINOKUROV et al., 2009; MARTYNOV et al., 2015). Por outro lado, na etapa final de sua digestão, verifica-se a participação das enzimas com caráter alcalino, como as proteases séricas.

Desta forma, tendo em vista que esta praga representa uma das maiores causas de perda na produção e, comercialização de grãos armazenados, decidiu-se avaliar a promissora potencialidade do inibidor isolado das sementes de *C. plumieri* em inibir a protease sérica isolada do inseto, conforme descrito por Da Silva, (2019) (Figura 57).

Como podemos verificar, na canaleta 1 (controle) ocorreu a hidrólise de caseína promovida pela protease do inseto, uma vez que é apresentado uma região de menor coloração (degradação da caseína). Por outro lado, nas demais canaletas, é possível observar a inibição induzida por parte dos inibidores testados, em que os inibidores SBTI e ICWV (*C. plumieri*) foram os únicos que apresentaram maior especificidade pela protease, alcançando uma taxa de inibição equivalente a 100%.

Figura 57: teste de inibição *in vitro* com a protease isolada do intestino do inseto praga *T. castaneum*. Canaleta 1: controle (protease do inseto); canaleta 2: protease do inseto inibida por benzamidina; canaleta 3: protease do inseto inibida por SBTI e na canaleta 3: protease do inseto inibida pelo inibidor de tripsina isolado em nossa pesquisa.

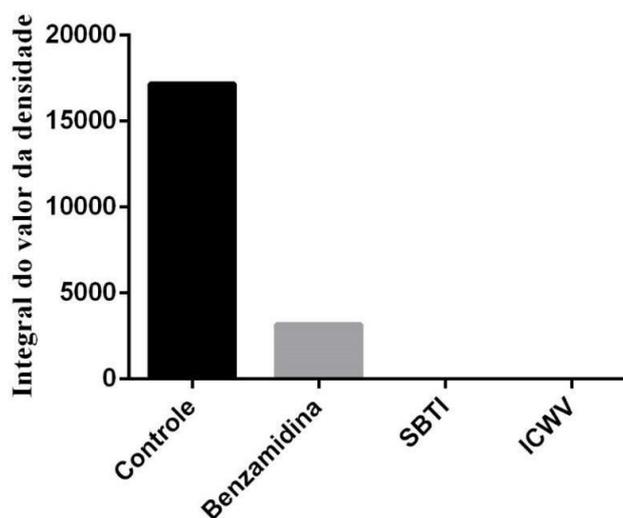


Fonte: elaborada pelo autor, 2020

Além de representarmos a taxa da degradação da caseína por zimografia, efetuamos uma quantificação densitométrica, através da quantificação das bandas utilizando o software de análise Image J. (SEYEDIAN et al., 2010) (Figura 58).

De fato, quando confrontamos as duas análises, podemos verificar que a proteína isolada das sementes de *C. plumieri* apresentou uma especificidade equivalente à obtida com o inibidor comercial SBTI.

Figura 58: análise densitométrica da degradação da caseína polimerizada em gel de poliacrilamida. Integralização efetuada com software de análise Image J.

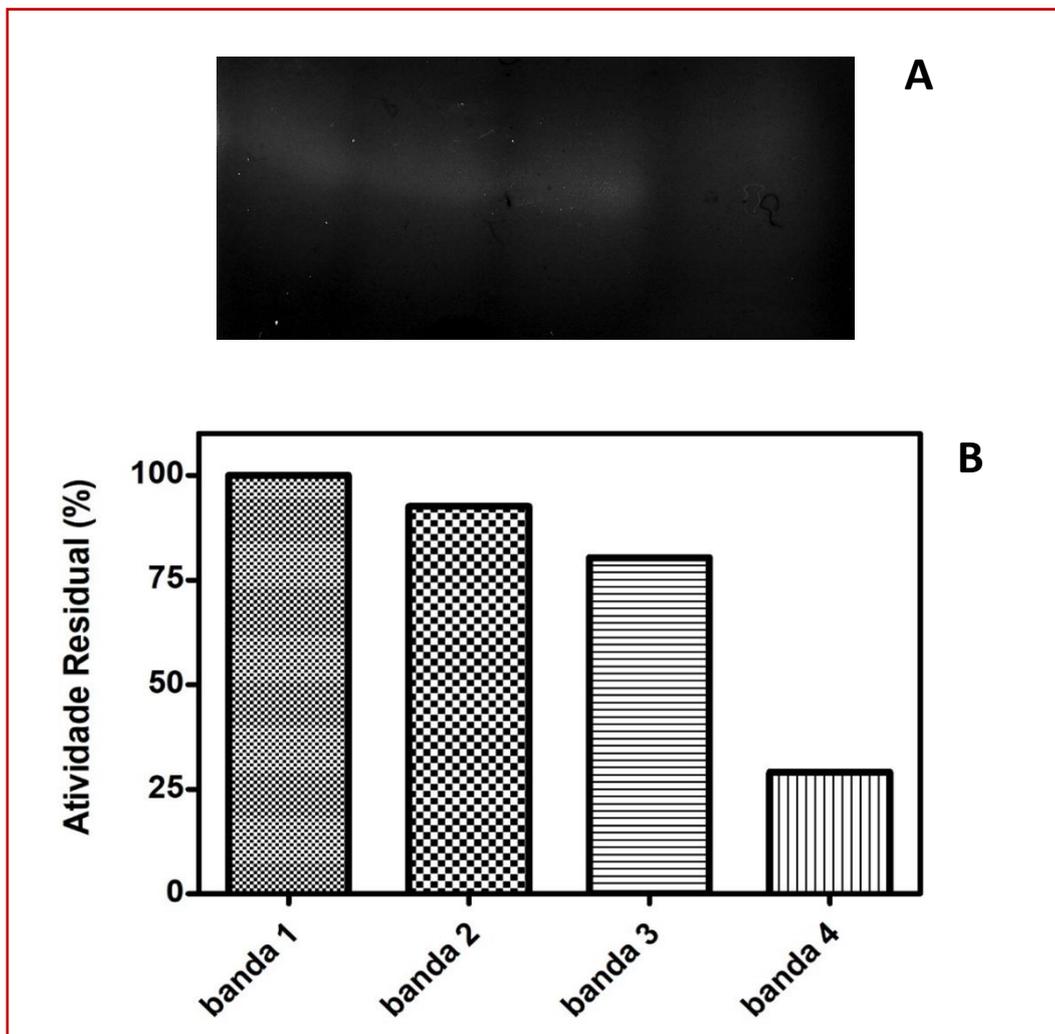


Fonte: elaborada pelo autor, 2020

Posteriormente, foi avaliado a taxa de inibição específica, em que os inibidores propostos tiveram suas concentrações igualadas (0,023 mg/mL). Na Figura 59-A está representado a degradação por zimografia, em que da esquerda para direita, foram aplicadas as amostras: controle (protease do inseto); protease

inibida por benzamidina; protease inibida por SBTI e protease inibida pelo inibidor estudado (ICWV) respectivamente. Por outro lado, na Figura 59-B encontram-se integralizados as taxas de inibição para as amostras testadas.

Figura 59: Teste de inibição *in vitro* com a protease isolada do intestino do inseto *T. castaneum* e, análise densitométrica da degradação da caseína com software de análise Image J.



Fonte: elaborada pelo autor, 2020

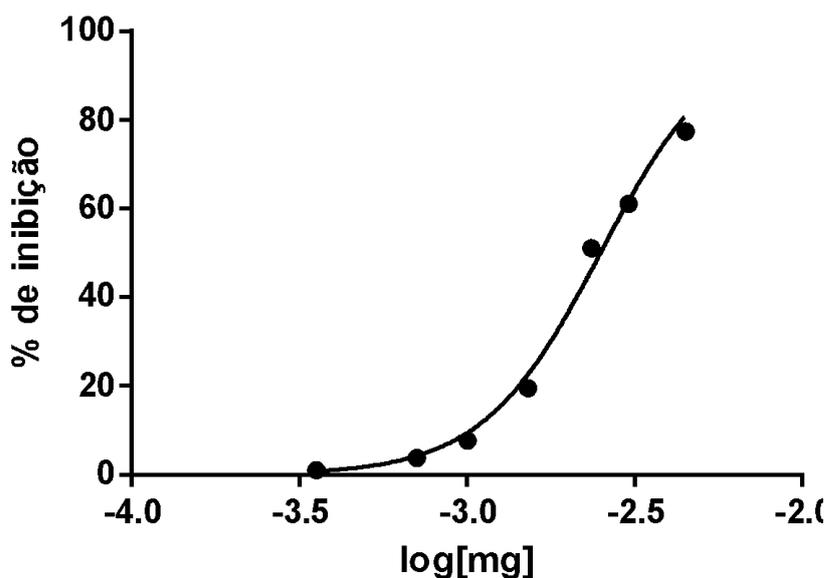
A análise da figura nos mostra de forma mais detalhada que nas condições propostas, a única molécula inibitória que apresentou maior especificidade para a enzima testada foi o inibidor isolado nesta pesquisa. Revelando uma provável eficiência em combater a proliferação dessas pragas, assim como minimizar os danos acarretados em grãos armazenados. Embora tenha-se alcançado estes resultados preliminares (*in vitro*), no tocante a aplicação biotecnológica para o inibidor estudado; percebe-se que demais análises são necessárias, bem como

avaliar os efeitos fisiológicos/nutricionais que a molécula proporciona aos animais que por ela se alimentem.

### 5.22 Determinação de Parâmetros Cinéticos (IC50 e Ki)

Como foi discutido em momentos anteriores, a interação enzima-inibidor é marcada pela alta complementaridade, ao ponto de nos indicar quão potente é a depleção que esta molécula ocasiona na catálise enzimática. Embora tenhamos obtido respostas, quanto a eficiência do inibidor em reduzir a degradação de caseína (protease do inseto), decidimos avaliar a especificidade da molécula frente a tripsina comercial, cujos resultados expressos, são mostrados na (Figura 60).

Figura 60: Cálculo de IC50 para a inibição de tripsina comercial com a proteína isolada das sementes de *C. plumieri*.



Fonte: elaborada pelo autor, 2020

Por meio da regressão linear, obtivemos o IC50 de 0,0025 mg/mL e, através da equação de Cheg e Prosof, chegamos à constante de inibição (Ki) de 1,63 µg/mL.

## 6. CONCLUSÃO

### 6.1 Serino protease isolada de *C. stipularia*

- ❖ A espécie vegetal descrita no capítulo I foi identificada como *C.stipularia*;
- ❖ O extrato enzimático preparado com as sementes da *C. stipularia* apresentou atividade amidásica;
- ❖ As sementes verdes de *C. stipularia* mostrou atividade proteolítica em maior proporção que as sementes secas;
- ❖ O estudo de aplicação biotecnológica proposta na pesquisa revelou elevada capacidade coagulante com extrato vegetal;
- ❖ A atividade coagulante do EB apresentou maior eficiência quando aquecido a 50°C;
- ❖ O sistema de precipitação trifásico possibilitou o fracionamento da serino protease com maior taxa de recuperação;
- ❖ A metodologia proposta permitiu a purificação da molécula num só passo cromatográfico;
- ❖ A massa da enzima foi estimada em 45 kDa aproximadamente;
- ❖ A protease purificada revelou atividades ótimas em pH 8,0 e 50 °C.
- ❖ A enzima isolada se mostrou específica para um único substrato conjugado com *p*-nitroanilina (BAPNA); e apresentou o  $k_m$  de apenas 0,01775 mg/mL e,  $V_{max}$  de 0,1082 mM/min.;

### 6.2 Inibidor de tripsina isolado de *C. plumieri*

- A espécie vegetal descrita no capítulo II foi identificada como *C.plumieri*;
- O Extrato bruto preparado com as sementes de *C. plumieri* mostrou atividade inibitória perante ensaio enzimático realizado com a tripsina bovina comercial;
- A cromatografia líquida realizada possibilitou a purificação da molécula num só passo cromatográfico;
- A massa aproximada da molécula foi estimada em 50 kDa;

- Quando submetido à atividade com diferentes proteases, o inibidor isolado apresentou especificidade apenas para a enzima tripsina;
- A avaliação dos parâmetros cinéticos mostrou valores de IC<sub>50</sub> e K<sub>i</sub> de 0,0025 mg/mL e 1,63µg/mL respectivamente.
- A metodologia de aplicação biotecnológica defendida permitiu identificar ação inibitória para a tripsina-símili isolada do intestino do inseto praga *T. castaneun*;
- Quando comparado com demais inibidores comerciais, a molécula isolada nesta pesquisa apresentou a maior ação depletiva na enzima do inseto, revelando uma possível utilização no controle desta praga;

## REFERÊNCIAS

- ABEQ, A indústria química e o seu desenvolvimento no âmbito da engenharia. **Revista Brasileira de Engenharia Química**, 2014.
- ABIQUIM, **Desenvolvimento da Indústria Química**. Associação Brasileira das Indústrias Químicas. 2010.
- ABIQUIM, **Desenvolvimento da Indústria Química**. Associação Brasileira das Indústrias Químicas. 2017.
- ADAMS, Joseph P. et al. Biocatalysis: A pharma perspective. **Advanced Synthesis & Catalysis**, v. 361, n. 11, p. 2421-2432, 2019.
- AGHAALI, Negar et al. Protease inhibitor from the crude extract of plant seeds affects the digestive proteases in *Hyphantria cunea* (Lep.: Arctiidae). **Journal of Plant Protection Research**, v. 53, n. 4, 2013.
- AHMED, Bahar; AL-HOWIRINY, Tawfeq A.; MOSSA, Jaber S. Crotalic and emarginelic acids: Two triterpenes from *Crotalaria emarginella* and anti-inflammatory and anti-hepatotoxic activity of crotalic acid. **Phytochemistry**, v. 67, n. 10, p. 956-964, 2006.
- AHMED, Bahar; AL-HOWIRINY, Tawfeq A.; MOSSA, Jaber S. Crotasteroidocin: A new steroidoid from *Crotalaria emarginella* and its anti-inflammatory activity. **Zeitschrift für Naturforschung B**, v. 61, n. 5, p. 629-636, 2006.
- AHMED, Isam A. Mohamed et al. Dubiumin, a chymotrypsin-like serine protease from the seeds of *Solanum dubium* Fresen. **Phytochemistry**, v. 70, n. 4, p. 483-491, 2009.
- ALICI, Esma Hande; ARABACI, Gulnur. A novel serine protease from strawberry (*Fragaria ananassa*): purification and biochemical characterization. **International journal of biological macromolecules**, v. 114, p. 1295-1304, 2018.
- ARIMA, Kei; YU, Juhyun; IWASAKI, Shintiro. [30] Milk-clotting enzyme from *Mucor pusillus* var. Lindt. In: **Methods in enzymology**. Academic Press, 1970. p. 446-459.
- ARRUDA, Heder Jobbins de. Produção industrial de enzimas e aplicações no processo cervejeiro: **uma revisão da literatura**. **Congresso Brasileiro de Engenharia de Produção**. 2017.
- ASIF-ULLAH, Mufti; KIM, Key-Sun; YU, Yeon Gyu. Purification and characterization of a serine protease from *Cucumis trigonus* Roxburghii. **Phytochemistry**, v. 67, n. 9, p. 870-875, 2006.
- AUGUSTO, C.V. et al. Giant Amazonian fish pirarucu (*Arapaima gigas*): its viscera as a source of thermostable trypsin. **Food chemistry**, v. 133, n. 4, p. 1596-1602, 2012.
- AVILÉS-GAXIOLA, Sara; CHUCK-HERNÁNDEZ, Cristina; SERNA SALDIVAR, Sergio O. Inactivation methods of trypsin inhibitor in legumes: a review. **Journal of food science**, v. 83, n. 1, p. 17-29, 2018.

AZARKAN, Mohamed et al. The papaya Kunitz-type trypsin inhibitor is a highly stable  $\beta$ -sheet glycoprotein. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Proteins and Proteomics**, v. 1764, n. 6, p. 1063-1072, 2006.

BADGUJAR, Shamkant B.; MAHAJAN, Raghunath T. Nivulian-II a new milk clotting cysteine protease of *Euphorbia nivulia* látex. **International Journal of Biological Macromolecules**.70. 391-398. 2014.

BAJAJ, Priyanka et al. Expression and purification of biologically active recombinant human paraoxonase 1 from inclusion bodies of *Escherichia coli*. **Protein expression and purification**, v. 115, p. 95-101, 2015.

BEYA, Nesrine, DEBBEBIB, Hajer, ABIDIA, FeridMARZOUKIA, M. Nejib, SALAH, Abderraouf Ben. The non-edible parts of fennel (*Foeniculum vulgare*) as a new milk-clotting protease source. **Industrial Crops and Products**. 112. 181-187. 2018.

BEZERRA, César da Silva et al. Estudo do potencial inseticida de um inibidor de proteinase de sementes de *Inga vera* sobre o desenvolvimento de *Anagasta kuehniella* (Lepidoptera: Pyralidae): aspectos fisiológicos e bioquímicos. 2014.

BIANCHETTI, Giulia O.; DEVLIN, Carolyn L.; SEDDON, Kenneth R. Bleaching systems in domestic laundry detergents: a review. **Rsc Advances**, v. 5, n. 80, p. 65365-65384, 2015.

BILAL, Muhammad et al. Emerging contaminants of high concern and their enzyme-assisted biodegradation—a review. **Environment international**, v. 124, p. 336-353, 2019.

BOTANY.CZ. Disponível em <<https://botany.cz/en/centrosema-plumieri/>> acesso em 28 de agosto de 2018.

BRADFORD, Marion M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical biochemistry**, v. 72, n. 1-2, p. 248-254, 1976.

BRANDÃO-COSTA, Romero MP; ARAÚJO, Vivianne Ferreira; PORTO, Ana Lucia F. CgTI, a novel thermostable Kunitz trypsin-inhibitor purified from *Cassia grandis* seeds: Purification, characterization and termiticidal activity. **International journal of biological macromolecules**, v. 118, p. 2296-2306, 2018.

BRANDL, Trixi et al. Trypsin inhibitors for the treatment of pancreatitis. **Bioorganic & medicinal chemistry letters**, v. 26, n. 17, p. 4340-4344, 2016.

BRENDA. **Institute of Biochemistry and Bioinformatics at the Technical, University of Braunschweig**. Germany. [www.brenda-enzymes.org](http://www.brenda-enzymes.org). 2012.

BRITO, Ana Catarina Facundo de; PONTES, Daniel de Lima. **A evolução da Indústria Química**. Programa para Universidade a Distância. Universidade Federal do Rio Grande do Norte. 2017.

BURKART, A. Las leguminosas argentinas: silvestres y cultivadas. 2. ed. Buenos Aires: **Acme Agency**. 579 p. 1952.

CABRERA-OROZCO, A.; JIMÉNEZ-MARTÍNEZ, C.; DÁVILA-ORTIZ, G. Soybean: Non-nutritional factors and their biological functionality. **Soybean: Bio-Active Compounds**, p. 387-410, 2013.

- CAMPBELL, M. K. **Bioquímica**. 3ª ed. São Paulo: Artes Médicas, 2003.
- CAREY, F. A.; SUNDBERG, R. J. **Advanced Organic Chemistry: Part A: Structure and Mechanisms**, ed 5. Springer, 2007.
- CARRASCHI, S. P. et al. Toxicidade aguda e risco ambiental de surfactantes agrícolas para o guaru *Phalloceros caudimaculatus* (Pices: Poecilidae). **Journal of the Brazilian Society Ecotoxicology**, v. 7, n. 1, p. 28-32, 2012.
- CHAUDHARY, Navneet S. et al. Purification and characterization of a trypsin inhibitor from *Putranjiva roxburghii* seeds. **Phytochemistry**, v. 69, n. 11, p. 2120-2126, 2008.
- CHEN, et al. Influence of degree of hydrolysis on functional properties, antioxidant and ACE inhibitory activities of egg white protein hydrolysate. **Food Science and Biotechnology**, v. 21, n. 1, p. 27-34, 2012.
- CHEN, Yeming et al. A two-chain aspartic protease present in seeds with high affinity for peanut oil bodies. **Food chemistry**, v. 241, p. 443-451, 2018.
- CHENG, Hsien C. The power issue: Determination of KB or Ki from IC50: A closer look at the Cheng–Prusoff equation, the Schild plot and related power equations. **Journal of pharmacological and toxicological methods**, v. 46, n. 2, p. 61-71, 2001.
- CHEVREUIL, Larissa Ramos et al. Partial purification of trypsin inhibitors from *Parkia* seeds (Fabaceae). **Hoehnea**, v. 41, n. 2, p. 181-186, 2014.
- CHINNADURAI, Gandhi Shree; KRISHNAN, Sivakumar; PERUMAL, Palani. Studies on detection and analysis of proteases in leaf extract of medicinally important plants. **Phytomedicine**, v. 40, p. 176-188, 2018.
- CHOI, Jung-Min; HAN, Sang-Soo; KIM, Hak-Sung. Industrial applications of enzyme biocatalysis: Current status and future aspects. **Biotechnology advances**, v. 33, n. 7, p. 1443-1454, 2015.
- CHOI, Jung-Min; HAN, Sang-Soo; KIM, Hak-Sung. Industrial applications of enzyme biocatalysis: Current status and future aspects. **Biotechnology advances**, v. 33, n. 7, p. 1443-1454, 2015.
- CHOONIA, Huzaifa S.; LELE, S. S. Three phase partitioning of  $\beta$ -galactosidase produced by an indigenous *Lactobacillus acidophilus* isolate. **Separation and Purification Technology**, v. 110, p. 44-50, 2013.
- CLEMENTE, Alfonso; SONNANTE, Gabriella; DOMONEY, Claire. Bowman-Birk inhibitors from legumes and human gastrointestinal health: current status and perspectives. **Current Protein and Peptide Science**, v. 12, n. 5, p. 358-373, 2011.
- COLLADOS, Ana et al. Applying food enzymes in the kitchen. **International Journal of Gastronomy and Food Science**, p. 100212, 2020.
- COSCUETA, Ezequiel R. et al. Enzymatic soy protein hydrolysis: A tool for biofunctional food ingredient production. **Food chemistry: X**, v. 1, p. 100006, 2019.

COX, M. M.; DOUDNA, J. A. O'DONNELL, M. **Biologia molecular: princípios e técnicas**, Artmed, 2012.

CROWELL, Andrew MJ; WALL, Mark J.; DOUCETTE, Alan A. Maximizing recovery of water-soluble proteins through acetone precipitation. **Analytica chimica acta**, v. 796, p. 48-54, 2013.

CRUZ, Ana CB et al. Bioinsecticidal activity of a novel Kunitz trypsin inhibitor from Catanduva (*Piptadenia moniliformis*) seeds. **Plant physiology and biochemistry**, v. 70, p. 61-68, 2013.

DA SILVA, Antônio Thomás, **Purificação e Caracterização de uma Tripsina-Similar de Larvas do Besouro vermelho da Farinha (*Tribolium Castaneum*)**, 2019. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal de Alagoas.

DABHADE, Arvind R.; MOKASHE, Narendra U.; PATIL, Ulhas K. Purification, characterization, and antimicrobial activity of nontoxic trypsin inhibitor from *Albizia amara* Boiv. **Process Biochemistry**, v. 51, n. 5, p. 659-674, 2016.

DE FARIAS, Vilmaria Albuquerque et al. Noni (*Morinda citrifolia* L.) fruit as a new source of milk-clotting cysteine proteases. **Food Research International**, v. 127, p. 108689, 2020.

DE SOUSA, Rita de Cássia Pompeu et al. Tecnologia de bioprocesso para produção de alimentos funcionais. **Revista Agro@mbiente On-line**, v. 7, n. 3, p. 366-372, 2013.

DE SOUZA, D. D. et al. Partial purification and characterization of a trypsin inhibitor isolated from *Adenanthera pavonina* L. seeds. **South African journal of botany**, v. 104, p. 30-34, 2016.

DEL ROSSO, James Q. Application of protease technology in dermatology: rationale for incorporation into skin care with initial observations on formulations designed for skin cleansing, maintenance of hydration, and restoration of the epidermal permeability barrier. **The Journal of clinical and aesthetic dermatology**, v. 6, n. 6, p. 14, 2013.

DEMAIN, Arnold L.; FANG, Aiqi. The natural functions of secondary metabolites. In: **History of modern biotechnology I**. Springer, Berlin, Heidelberg, 2000. p. 1-39.

DENNISON, Clive; LOVRIEN, Rex. Three phase partitioning: concentration and purification of proteins. **Protein expression and purification**, v. 11, n. 2, p. 149-161, 1997.

DETTORE, Chris; GENENCOR, A. Comparative life-cycle assessment (LCA) of textile bleaching systems: Gentle Power Bleach™ vs. conventional bleaching system. In: **Scientific Poster. AATCC International Conference, 22e24 March**. 2011.

DEVLIN, Thomas M. **Manual a bioquímica: com correlações clínicas**. Editora Blucher, 2011.

DHANANJAY S. K; MULIMANI, V. H. Three-phase partitioning of alpha-galactosidase from fermented media of *Aspergillus oryzae* and comparison with conventional purification techniques. *Ind Microbiol Biotechnol*.123-8. 2009.

- DIAS, Lucas P. et al. A trypsin inhibitor purified from *Cassia leiandra* seeds has insecticidal activity against *Aedes aegypti*. **Process Biochemistry**, v. 57, p. 228-238, 2017.
- DIAZ-MENDOZA, Mercedes et al. Plant senescence and proteolysis: two processes with one destiny. **Genetics and molecular biology**, v. 39, n. 3, p. 329-338, 2016.
- DISSANAYAKA, D. M. S. K.; SAMMANI, A. M. P.; WIJAYARATNE, L. K. W. Orientation of *Tribolium castaneum* (Herbst)(Coleoptera: Tenebrionidae) adults at various distances to different concentrations of aggregation pheromone 4, 8-dimethyldecanal. **Journal of Stored Products Research**, v. 87, p. 101631, 2020.
- DOS SANTOS, Claudio Wilian Victor et al. Purification and characterization of trypsin from *Luphiosilurus alexandri* pyloric cecum. **Biochemistry and biophysics reports**, v. 8, p. 29-33, 2016.
- DOS SANTOS, Dávida Maria Ribeiro Cardoso et al. Trypsin purified from *Coryphaena hippurus* (common dolphinfish): Purification, characterization, and application in commercial detergents. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, p. 101584, 2020.
- EMBRAPA, **Produção de Enzimas é Segmento Estratégico para a Economia Verde.**, 2015. Disponível em <https://www.embrapa.br/busca-de-noticias/-/noticia/7691362/producao-de-enzimas-e-segmento-estrategico-para-a-economia-verde>>acesso em 03 de setembro de 2018.
- ERLANGER, Bernard F.; KOKOWSKY, Nicholas; COHEN, William. The preparation and properties of two new chromogenic substrates of trypsin. **Archives of biochemistry and biophysics**, v. 95, n. 2, p. 271-278, 1961.
- FEIJOO-SIOTA, Lucía; VILLA, Tomás G. Native and biotechnologically engineered plant proteases with industrial applications. **Food and Bioprocess Technology**, v. 4, n. 6, p. 1066-1088, 2011.
- FELIPE, Rafaella Teles Arantes; OLIVEIRA, Juraci Alves de; LEÃO, Gabriela Alves. Potencial de *Cajanus cajan* e *Crotalaria spectabilis* para fitoremediação: absorção de arsênio e respostas antioxidativas. **Revista Árvore**, v. 33, n. 2, p. 245-254, 2009.
- FERNANDES, Joana, Produção de queijo: **origem dos coalhos**. Disponível em: < [https://digitalis-dsp.uc.pt/bitstream/10316.2/33613/1/Agrotec8\\_artigo33.pdf](https://digitalis-dsp.uc.pt/bitstream/10316.2/33613/1/Agrotec8_artigo33.pdf)> Acesso em 06 de janeiro de 2020.
- FLORES, A.S. e MIOTTO, S.T.S. Aspectos fitogeográficos das espécies de *Crotalaria* L. (Leguminosae – Faboideae) na região Sul do Brasil. **Acta Botanica Brasilica**, 19(2): 245-249. 2005.
- FOOD INGREDIENTS BRASIL, **Dossiê Enzimas**. A EVOLUÇÃO DAS ENZIMAS COAGULANTES. Disponível em:< [https://revista-fi.com.br/upload\\_arquivos/201606/2016060537111001467221867.pdf](https://revista-fi.com.br/upload_arquivos/201606/2016060537111001467221867.pdf)> Acesso em 06 de janeiro de 2020.
- GADGE, Prafull P. et al. A bifunctional  $\alpha$ -amylase/trypsin inhibitor from pigeonpea seeds: Purification, biochemical characterization and its bio-efficacy against

Helicoverpa armigera. **Pesticide biochemistry and physiology**, v. 125, p. 17-25, 2015.

GAGAOUA, Mohammed et al. Three phase partitioning, a scalable method for the purification and recovery of cucumisin, a milk-clotting enzyme, from the juice of Cucumis melo var. reticulatus. **International journal of biological macromolecules**, v. 102, p. 515-525, 2017.

GAGAOUA, Mohammed et al. Three-phase partitioning as an efficient method for the purification and recovery of ficin from Mediterranean fig (Ficus carica L.) latex. **Separation and Purification Technology**, v. 132, p. 461-467, 2014.

GARG, Romy; THORAT, Bhaskar N. Nattokinase purification by three phase partitioning and impact of t-butanol on freeze drying. **Separation and Purification Technology**, v. 131, p. 19-26, 2014.

GARRIDO, Marlon da Silva et al. Manejo da crotalária e do guandu no controle de nematoses do inhame. **Summa Phytopathologica**, v. 34, n. 3, p. 222-227, 2008.

**GE Healthcare Life Science**. Disponível em <http://www.gelifesciences.com/webapp/wcs/stores/servlet/productById/en/GELi eSciences-br/17061260>> Acessado em Janeiro de 2016.

GERAIS-BRASIL, Minas. **PURIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE PROTEASES DIGESTIVAS TRIPSINA-LIKE DO INTESTINO DA LAGARTA DA SOJA ENVOLVIDAS NO MECANISMO DE INTERAÇÃO PLANTA-INSETO**. 2009. Tese de Doutorado. Universidade Federal de Viçosa.

GOHARA, David W.; DI CERA, Enrico. Allostery in trypsin-like proteases suggests new therapeutic strategies. **Trends in biotechnology**, v. 29, n. 11, p. 577-585, 2011.

GOLUNSKI, Simone et al. Ethanol precipitation and ultrafiltration of inulinases from Kluyveromyces marxianus. **Separation and Purification Technology**, v. 78, n. 3, p. 261-265, 2011.

GUIMARÃES, Lays Cordeiro et al. Purification and characterization of a Kunitz inhibitor from Poincianella pyramidalis with insecticide activity against the Mediterranean flour moth. **Pesticide biochemistry and physiology**, v. 118, p. 1-9, 2015.

GURUMALLESH, Poorani et al. A systematic reconsideration on proteases. **International journal of biological macromolecules**, v. 128, p. 254-267, 2019.

GURUMALLESH, Poorani et al. A systematic reconsideration on proteases. **International journal of biological macromolecules**, v. 128, p. 254-267, 2019.

HARVEY, R. A; FERRIER, D. R. **Bioquímica Ilustrada**. Artmed, 2012.

HERBOTS, I., KOTTWITZ, B., REILLY, P.J., ANTRIM, R.L., BURROWS, H., LENTING, H.B.M., VIKARI, L., SUURNÄKKI, A., NIKU-PAAVOLA, M.-L., PERE, J., BUCHERT, J., Enzymes, 4. Non-food application. In: Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry. **Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim**. 2008.

- HERNÁNDEZ-LEDESMA, Blanca; HSIEH, Chia-Chien. Chemopreventive role of food-derived proteins and peptides: A review. **Critical reviews in food science and nutrition**, v. 57, n. 11, p. 2358-2376, 2017.
- JALALI, Mahboubeh et al. Zymogram analysis of partially purified protein from two leguminose seeds on protease activity of Indian meal moth, *Plodia interpunctella* Hübner (Lepidoptera: Pyralidae). **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 4, n. 3, p. 404-408, 2015.
- JEGANNATHAN, Kenthorai Raman; NIELSEN, Per Henning. Environmental assessment of enzyme use in industrial production—a literature review. **Journal of cleaner production**, v. 42, p. 228-240, 2013.
- JELLOULI, Kemel et al. New alkaline trypsin from the intestine of grey triggerfish (*Balistes capriscus*) with high activity at low temperature: purification and characterisation. **Food Chemistry**, v. 116, n. 3, p. 644-650, 2009.
- KADAM, Suhas K. et al. Enzymatic analysis, structural study and molecular docking of laccase and catalase from *B. subtilis* SK1 after textile dye exposure. **Ecological Informatics**, v. 48, p. 269-280, 2018.
- KANDASAMY, Nadiya et al. Eco-benign enzymatic dehairing of goatskins utilizing a protease from a *Pseudomonas fluorescens* species isolated from fish visceral waste. **Journal of Cleaner Production**, v. 25, p. 27-33, 2012.
- KANSAL, Rekha et al. Purification, characterization and evaluation of insecticidal potential of trypsin inhibitor from mungbean (*Vigna radiata* L. Wilczek) seeds. **Acta physiologiae plantarum**, v. 30, n. 6, p. 761, 2008.
- KAZAMI, Nao et al. A simple procedure for preparing chitin oligomers through acetone precipitation after hydrolysis in concentrated hydrochloric acid. **Carbohydrate polymers**, v. 132, p. 304-310, 2015.
- KETNAWA, Sunantha et al. Three-phase partitioning and proteins hydrolysis patterns of alkaline proteases derived from fish viscera. **Separation and Purification Technology**, v. 132, p. 174-181, 2014.
- KHANGEMBAM, Bronson Kumar; CHAKRABARTI, Rina. Trypsin from the digestive system of carp *Cirrhinus mrigala*: purification, characterization and its potential application. **Food chemistry**, v. 175, p. 386-394, 2015.
- KIM, N. et al. Production of functional recombinant bovine trypsin in transgenic rice cell suspension cultures. **Protein expression and purification**, v. 76, n. 1, p. 121-126, 2011.
- KIM, Nan-Sun et al. High-level production of recombinant trypsin in transgenic rice cell culture through utilization of an alternative carbon source and recycling system. **Enzyme and microbial technology**, v. 63, p. 21-27, 2014.
- KOBAYASHI, H. Prevention of cancer and inflammation by soybean protease inhibitors. **Frontiers in bioscience (Elite edition)**, v. 5, p. 966-973, 2013.
- KTARI, Naourez et al. Trypsin from zebra blenny (*Salaria basilisca*) viscera: Purification, characterisation and potential application as a detergent additive. **Food chemistry**, v. 130, n. 3, p. 467-474, 2012.

KUMARI, Moni; SHARMA, Anurag; JAGANNADHAM, M. V. Decolorization of crude latex by activated charcoal, purification and physico-chemical characterization of religiosin, a milk-clotting serine protease from the latex of *Ficus religiosa*. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 58, n. 13, p. 8027-8034, 2010.

LAEMMLI, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, v. 227, p. 680–685, 1970.

LEWIS, G.P.; SCHRIRE, B.; MACHINDER, B. & LOCK, M. Legumes of the world. **Kew: Royal Botanic Gardens**. 577 p. 2005.

LI, Qing et al. Commercial proteases: present and future. **FEBS letters**, v. 587, n. 8, p. 1155-1163, 2013.

LI, Zhao et al. Purification and characterisation of a protease (tamarillin) from tamarillo fruit. **Food chemistry**, v. 256, p. 228-234, 2018.

LIANG, Guijiang et al. Modification of soy protein isolates using combined pre-heat treatment and controlled enzymatic hydrolysis for improving foaming properties. **Food Hydrocolloids**, v. 105, p. 105764, 2020.

LIMA, HC de. Leguminosas arbóreas da Mata Atlântica: uma análise da riqueza, padrões de distribuição geográfica e similaridades florísticas em remanescentes florestais do estado do Rio de Janeiro. **Tese de Doutorado, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro**, 2000.

LLORENTE, B. E. et al. Use of artichoke (*Cynara scolymus*) flower extract as a substitute for bovine rennet in the manufacture of Gouda-type cheese: characterization of aspartic proteases. **Food chemistry**, v. 159, p. 55-63, 2014.

MADHU, Amit; CHAKRABORTY, J. N. Developments in application of enzymes for textile processing. **Journal of cleaner production**, v. 145, p. 114-133, 2017.

MAGON GARCIA, Jéssica et al. O gênero *Crotalaria* L.(Leguminosae, Faboideae, Crotalariaeae) na Planície de Inundação do Alto Rio Paraná, Brasil. **Revista Brasileira de Biociências**, v. 11, n. 2, 2013.

MANSUR, Alberto Ramy. A indústria de processamento químico no Brasil: suas motivações para pesquisa e desenvolvimento e suas interfaces com as políticas governamentais. **Química Nova**, v. 28, p. S104-S106, 2005.

MARCHI, Marcos de, Associação Brasileira das Indústrias Químicas: 22º encontro anual da indústria Química, 2017.

MARIAM, SH Sharifah et al. Purification of rabbit polyclonal immunoglobulin G with ammonium sulphate precipitation and mixed-mode chromatography. **Separation and Purification Technology**, v. 144, p. 133-138, 2015.

MARIÑO BOHÓRQUEZ, Mayra Alejandra et al. Avaliação do etanol como agente precipitante de glicosil hidrolases produzidas por *Trichoderma harzianum* P49P11. 2014.

MARTYNOV, Alexander G. et al. Functional analysis of C1 family cysteine peptidases in the larval gut of *Tenebrio molitor* and *Tribolium castaneum*. **BMC genomics**, v. 16, n. 1, p. 75, 2015.

MAURER, K. H. (2004). Detergent Proteases. **Current Opinion in Biotechnology**, v.15, p. 330–334, 2004.

MAZORRA-MANZANO, Miguel Angel et al. Sour orange Citrus aurantium L. flowers: a new vegetable source of milk-clotting proteases. **LWT-Food Science and Technology**, v. 54, n. 2, p. 325-330, 2013.

MEDA, A.R. & FURLANI, P.R. Tolerance to aluminum toxicity by tropical leguminous plants used as cover crops. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, 48(2): 309-317. 2005.

MERIÑO-CABRERA, Yaremis et al. Rational design of mimetic peptides based on the interaction between Inga laurina inhibitor and trypsins for Spodoptera cosmioides pest control. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, p. 103390, 2020.

MINAYA, Magaly Alejandra Brousett et al. **Avaliação das atividades farmacológicas de uma serinoprotease, isolada a partir do veneno total de Brothrops barnetti**. 2012.

MITIDIERI, S. et al. Detergentes biológicos biodegradáveis: avaliação das formulações do mercado. **Biociência**, v. 5, n. 26, p. 56-60, 2002.

MNIF, Ibtissem Hamza et al. A cysteine protease isolated from the latex of Ficus microcarpa: purification and biochemical characterization. **Applied biochemistry and biotechnology**, v. 175, n. 3, p. 1732-1744, 2015.

MOHANRAJ, Soundappan S. et al. Biochemical properties of a bacterially-expressed Bowman-Birk inhibitor from Rhynchosia sublobata (Schumach.) Meikle seeds and its activity against gut proteases of Achaea janata. **Phytochemistry**, v. 151, p. 78-90, 2018.

MORGADO, H. S. **Produção e caracterização de amilase do fungo Aspergillus awamori e sua utilização em dietas para frangos de corte**. Goiânia: UFG, 2013.

MORRIS, J.B. Special-purpose legume genetic resources conserved for agricultural, industrial, and pharmaceutical use. **Economic Botany**, 51(3): 251-263. 1997.

MOSOLOV, V. V.; LOGINOVA, M. D.; FEDURKINA, N. V.; BENKEN, I. I. The Biological significance of proteinase-inhibitors in plants. **Plant Science Letters**, v. 7, p. 77-80, 1976.

MÓTYÁN, János András; TÓTH, Ferenc; TŐZSÉR, József. Research applications of proteolytic enzymes in molecular biology. **Biomolecules**, v. 3, n. 4, p. 923-942, 2013.

NARENDER, T.; SHWETA; TANVIR, K.; RAO, M.S.; SRIVASTAVA, K. & PURI, S.K. Prenylated chalcones isolated from Crotalaria genus inhibits in vitro growth of the human malaria parasite Plasmodium falciparum. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**. 2005.

NASRI et al. Calcium dependent, alkaline detergent-stable trypsin from the viscera of Goby (*Zosterisessor ophiocephalus*): Purification and characterization, **Process Biochemistry**, v. 47, p. 1957–1964, 2012.

NELSON, David L.; COX, Michael M. **Princípios de Bioquímica de Lehninger-7**. Artmed Editora, 2013.

ODDEPALLY, Rajender; SRIRAM, Gopi; GURUPRASAD, Lalitha. Purification and characterization of a stable Kunitz trypsin inhibitor from *Trigonella foenum-graecum* (fenugreek) seeds. **Phytochemistry**, v. 96, p. 26-36, 2013.

OECD. Industrial Biotechnology and Climate Change: **Opportunities and Challenges. Organisation for Economic Co-operation and Development Publications, France**. 2011.

OGAWA, Haruko et al. Autoactivation of pancreatic trypsinogen is controlled by carbohydrate-specific interaction. **FEBS letters**, v. 589, n. 5, p. 569-575, 2015.

OPPERT, Brenda et al. Microarray analysis reveals strategies of *Tribolium castaneum* larvae to compensate for cysteine and serine protease inhibitors. **Comparative Biochemistry and Physiology Part D: Genomics and Proteomics**, v. 5, n. 4, p. 280-287, 2010.

PALAYAM, Malathy et al. Structural insights into a multifunctional inhibitor, 'AMTIN' from tubers of *Alocasia macrorrhizos* and its possible role in dengue protease (NS2B-NS3) inhibition. **International journal of biological macromolecules**, v. 113, p. 681-691, 2018.

PANDE, Monu et al. A novel serine protease cryptolepain from *Cryptolepis buchani*: purification and biochemical characterization. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 54, n. 26, p. 10141-10150, 2006.

PANDEY, Prabhash K.; JAMAL, Farrukh. Bio-potency of a 21 kDa Kunitz-type trypsin inhibitor from *Tamarindus indica* seeds on the developmental physiology of *H. armigera*. **Pesticide biochemistry and physiology**, v. 116, p. 94-102, 2014.

PANDO, Silvana C. et al. Primary sequence determination of a Kunitz inhibitor isolated from *Delonix regia* seeds. **Phytochemistry**, v. 57, n. 5, p. 625-631, 2001.

PANEZAI, Gul Makai et al. Effect of four plant extracts against *trogoderma granarium* and *tribolium castaneum*. **Pak. J. Bot**, v. 51, n. 3, p. 1149-1153, 2019.

PATEL, S. A critical review on serine protease: key immune manipulator and pathology mediator. **Allergologia et immunopathologia**, v. 45, n. 6, p. 579-591, 2017.

PAUL, Tanmay et al. Bacterial keratinolytic protease, imminent starter for NextGen leather and detergent industries. **Sustainable Chemistry and Pharmacy**, v. 3, p. 8-22, 2016.

PEIXOTO, P.G.; FUJITA, A.T.; ROQUE, A.C. Eventual effectiveness of *Crotalaria* in combat to mosquito *Aedes* (Meigen, 1818), **Acta Biologica Brasiliensia**. 1. 2596-0016. 2018.

PEREIRA, Hugo Juarez Vieira; SALGADO, Maria Cristina Oliveira; OLIVEIRA, Eduardo Brandt. Immobilized analogues of sunflower trypsin inhibitor-1 constitute a

- versatile group of affinity sorbents for selective isolation of serine proteases. **Journal of Chromatography B**, v. 877, n. 22, p. 2039-2044, 2009.
- PERKIN, L. C.; ELPIDINA, E. N.; OPPERT, B. RNA interference and dietary inhibitors induce a similar compensation response in *Tribolium castaneum* larvae. **Insect molecular biology**, v. 26, n. 1, p. 35-45, 2017.
- POLHILL, R.M. *Crotalaria* in Africa and Madagascar. **Kew: Royal Botanic Gardens**. 1982.
- PONTUAL, Emmanuel V. et al. Caseinolytic and milk-clotting activities from *Moringa oleifera* flowers. **Food chemistry**, v. 135, n. 3, p. 1848-1854, 2012.
- PRASAD, E. R.; DUTTA-GUPTA, A.; PADMASREE, K. Insecticidal potential of Bowman-Birk proteinase inhibitors from red gram (*Cajanus cajan*) and black gram (*Vigna mungo*) against lepidopteran insect pests. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, v. 98, n. 1, p. 80-88, 2010.
- QUEIROZ, L.P. de. **Leguminosas da caatinga**. Feira de Santana: Universidade Estadual de Feira de Santana. 467 p. 2009.
- RASOULI, Hassan et al. Anti-angiogenic potential of trypsin inhibitor purified from *Cucumis melo* seeds: Homology modeling and molecular docking perspective. **International journal of biological macromolecules**, v. 96, p. 118-128, 2017.
- RAWDKUEN, Saroat; VANABUN, Aten; BENJAKUL, Soottawat. Recovery of proteases from the viscera of farmed giant catfish (*Pangasianodon gigas*) by three-phase partitioning. **Process Biochemistry**, v. 47, n. 12, p. 2566-2569, 2012.
- RAWLINGS, Neil D. et al. The MEROPS database of proteolytic enzymes, their substrates and inhibitors in 2017 and a comparison with peptidases in the PANTHER database. **Nucleic acids research**, v. 46, n. D1, p. D624-D632, 2018.
- RIZZELLO, Carlo G. et al. Bioactive peptides from vegetable food matrices: Research trends and novel biotechnologies for synthesis and recovery. **Journal of Functional Foods**, v. 27, p. 549-569, 2016.
- ROCHA, Louisianny Guerra da et al. Evaluation of the leishmanicide action of ethanol extracts of *Crotalaria retusa* L.(Fabaceae). **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 19, n. 1A, p. 51-56, 2009.
- RUFINO, Fabiola PS et al. Inhibitory effects of a Kunitz-type inhibitor from *Pithecellobium dumosum* (Benth) seeds against insect-pests' digestive proteinases. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 63, p. 70-76, 2013.
- SALVADOR, Sofia Matos; NOVO, Carlos; DOMINGOS, Ana. Evaluation of the presence of aspartic proteases from *Centaurea calcitrapa* during seed germination. **Enzyme and microbial technology**, v. 38, n. 7, p. 893-898, 2006.
- SANDOVAL, Braddock A .; HYSTER, Todd K. Estratégias emergentes para expandir a caixa de ferramentas de enzimas em biocatálise. **Opinião Atual em Chemical Biology** , v. 55, p. 45-51, 2020.
- SANMAN, Laura E.; BOGYO, Matthew. Activity-based profiling of proteases. **Annual review of biochemistry**, v. 83, p. 249-273, 2014.

- SCHALLER, Andreas et al. From structure to function—a family portrait of plant subtilases. **New Phytologist**, v. 218, n. 3, p. 901-915, 2018.
- ŞEN, Aysu et al. Purification of  $\alpha$ -galactosidase from pepino (*Solanum muricatum*) by three-phase partitioning. **Separation and purification technology**, v. 83, p. 130-136, 2011.
- SEYEDIAN, Ramin et al. Enzymatic analysis of *Hemiscorpius lepturus* scorpion venom using zymography and venom-specific antivenin. **Toxicon**, v. 56, n. 4, p. 521-525, 2010.
- SHAH, Manzoor Ahmad; MIR, Shabir Ahmad; PARAY, Mohd Amir. Plant proteases as milk-clotting enzymes in cheesemaking: a review. **Dairy Science & Technology**, v. 94, n. 1, p. 5-16, 2014.
- SHAMSI, Tooba Naz et al. Purification and characterization of a novel trypsin-like protease from green-seeded chickpea (*Cicer arietinum*). **Preparative Biochemistry and Biotechnology**, v. 47, n. 5, p. 513-519, 2017.
- SHELDON, Roger A.; WOODLEY, John M. Role of biocatalysis in sustainable chemistry. **Chemical reviews**, v. 118, n. 2, p. 801-838, 2018.
- SIGMA-ALDRICH, **Sepharose Ion Exchange Media**, Disponível em <[http://www.sigmaaldrich.com/content/dam/sigmaaldrich/docs/Sigma/Product\\_Information\\_Sheet/df100pis.pdf](http://www.sigmaaldrich.com/content/dam/sigmaaldrich/docs/Sigma/Product_Information_Sheet/df100pis.pdf)> Acesso em Janeiro de 2016.
- SILVA, Ana Paula Pereira; ALVES, Daniela Maria; NÚNCIO, Fausto; WILIAN, Guilherme; NUNES, Raissa Coimbra; TORQUIM, Valdinéia; FERREIRA, Deusmaque Carneiro. **Avaliação da Biodegradabilidade dos detergentes comerciais**, VII Encontro de Tecnologia da UNIUBE, 2011.
- SILVA, E. T.; **Estabilização de Proteases para Aplicação Biotecnológica**. Dissertação (Mestrado em Desenvolvimento em Processos Ambientais) Universidade Católica de Pernambuco, Recife 2013.
- SILVA, Fravielle Karla Lopes da; SILVA, Marcos José da, **Sistemática do Gênero *Centrosema* Benth.** (Leguminosae, Papilionoideae, Phaseoleae) NO ESTADO DE GOIÁS, BRASIL. Disponível em [http://www.botanica.org.br/trabalhos-cientificos/63CNBot/63CNBot\\_stax\\_134.pdf](http://www.botanica.org.br/trabalhos-cientificos/63CNBot/63CNBot_stax_134.pdf) Acesso em 28 de agosto de 2018.
- SILVA, Janilson F. et al. Purification and partial characterisation of a trypsin from the processing waste of the silver mojarra (*Diapterus rhombeus*). **Food chemistry**, v. 129, n. 3, p. 777-782, 2011.
- SILVA, Tácio Oliveira da et al. Adubação orgânica da batata com esterco e, ou, *Crotalaria juncea*: I-produtividade vegetal e estoque de nutrientes no solo em longo prazo. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 31, n. 1, p. 39-49, 2007.
- SINGH, Ashwina et al. Comparative interaction study of amylase and surfactants for potential detergent formulation. **Journal of Molecular Liquids**, v. 261, p. 397-401, 2018.
- SINGH, Kunwar Awaneesh et al. Crinumin, a chymotrypsin-like but glycosylated serine protease from *Crinum asiaticum*: purification and physicochemical characterisation. **Food chemistry**, v. 119, n. 4, p. 1352-1358, 2010.

SIQUEIRA, Kennya Beatriz. O Mercado Consumidor de Leite e Derivados. Circular Técnica 120. **Embrapa**. ISSN 1678-037X. 2019.

SOUZA, E. F. **Aplicação de proteases e amilases produzidas por Bacillus sp. Smia-2 na remoção de manchas de tecidos**. Campos dos Goytacazes: UENF, 2012.

SPRENT, J.I. Nodulation in legumes. **Royal Botanic Gardens, Kew**. 2001.

SRILAKSHMI, J. et al. Commercial potential of fungal protease: past, present and future prospects. **Journal of Pharmaceutical, Chemical and Biological Sciences**, v. 2, n. 4, p. 218-234, 2015.

STRYER, L.; TYMOCZKO, J.L.; BERG, J.M. **Bioquímica**. Editora Guanabara Koogan LTDA. 6ª Ed. Rio de Janeiro. 2006.

SZEWIŃSKA, Joanna; SIMIŃSKA, Joanna; BIELAWSKI, Wiesław. The roles of cysteine proteases and phytocystatins in development and germination of cereal seeds. **Journal of plant physiology**, v. 207, p. 10-21, 2016.

TAVANO, Olga Luiza. Protein hidrólisis using proteases: Na importante tool for food biotechnology. **Juornal of Molecular Catalysis B; Enzymatic**, p. 1-11. 2013.

THOMAS, Emma L.; VAN DER HOORN, Renier AL. Ten prominent host proteases in plant-pathogen interactions. **International journal of molecular sciences**, v. 19, n. 2, p. 639, 2018.

THYS, Roberta Cruz Silveira. Produção, caracterização, purificação e aplicação de uma protease produzida pelo microrganismo *Microbacterium sp. kr10*. 2004.

TIAN, Li; et al. A cost-effective ELP-intein coupling system for recombinant protein purification from plant production platform. **PLoS one**, v. 6, n. 8, p. e24183, 2011.

TOMAR, Ritu; KUMAR, Reetesh; JAGANNADHAM, M. V. A stable serine protease, wrightin, from the latex of the plant *Wrightia tinctoria* (Roxb.) R. Br.: purification and biochemical properties. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 56, n. 4, p. 1479-1487, 2008.

TOUNSADI, Hanane et al. Impact of chemical substances used in textile industry on the employee's health: Epidemiological study. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 197, p. 110594, 2020.

TREMACOLDI, Célia Regina, **Proteases e Inibidores de Proteases na Defesa de Plantas Contra Pragas**. Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária Embrapa Amazônia Oriental Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. 2009.

TURK, Boris, Targeting proteases: successes, failures and future prospects. **Nature Publishing Group**. 2006.

UPADHYAY et al., Purification of recombinant ovalbumin from inclusion bodies of *Escherichia coli*, **Protein Expression and Purification**, v.117, p. 52–58. 2015.

VAGADIA, Brinda Harish; VANGA, Sai Kranthi; RAGHAVAN, Vijaya. Inactivation methods of soybean trypsin inhibitor—A review. **Trends in Food Science & Technology**, v. 64, p. 115-125, 2017.

- VALLÉS, Diego; CANTERA, Ana M.B. Antiacanthain A: New proteases isolated from *Bromelia antiacantha* Bertol. (Bromeliaceae). **International Journal of Biological Macromolecules** 113 (2018) 916–923. 2018.
- VALUEVA, Tatyana A. et al. Kunitz-type proteinase inhibitors from intact and *Phytophthora*-infected potato tubers. **FEBS letters**, v. 426, n. 1, p. 131-134, 1998.
- VAN BOEKEL, Martinus et al. A review on the beneficial aspects of food processing. **Molecular nutrition & food research**, v. 54, n. 9, p. 1215-1247, 2010.
- VAN DER HOORN, Renier AL. Plant proteases: from phenotypes to molecular mechanisms. **Annu. Rev. Plant Biol.**, v. 59, p. 191-223, 2008.
- VERMELHO, A. B. et al. Enzimas proteolíticas: Aplicações biotecnológicas. **Enzimas em biotecnologia-Produção, aplicações e mercado**, p. 273-287, 2008.
- VINOKUROV, K. S. et al. Digestive proteolysis organization in two closely related tenebrionid beetles: red flour beetle (*Tribolium castaneum*) and confused flour beetle (*Tribolium confusum*). **Archives of Insect Biochemistry and Physiology: Published in Collaboration with the Entomological Society of America**, v. 70, n. 4, p. 254-279, 2009.
- VOJCIC, L. et al. Advances in protease engineering for laundry detergents. **New biotechnology**, v. 32, n. 6, p. 629-634, 2015.
- WATI, Richa Kusuma et al. Three-phase partitioning of trypsin inhibitor from legume seeds. **Process Biochemistry**, v. 44, n. 12, p. 1307-1314, 2009.
- WOODARD, Susan L. et al. Maize (*Zea mays*)-derived bovine trypsin: characterization of the first large-scale, commercial protein product from transgenic plants. **Biotechnology and applied biochemistry**, v. 38, n. 2, p. 123-130, 2003.
- XU, J. et al. Green factory: plants as bioproduction platforms for recombinant proteins. **Biotechnology advances**, v. 30, n. 5, p. 1171-1184, 2012.
- YADAV, Subhash C.; PANDE, Monu; JAGANNADHAM, M. V. Highly stable glycosylated serine protease from the medicinal plant *Euphorbia milii*. **Phytochemistry**, v. 67, n. 14, p. 1414-1426, 2006.
- YANG, Yong et al. Serine proteases of parasitic helminths. **The Korean journal of parasitology**, v. 53, n. 1, p. 1, 2015.
- YOSHIKAWA, Mitsuyoshi et al. Isolation and some properties of a subtilisin inhibitor from barley. **The Journal of Biochemistry**, v. 79, n. 4, p. 765-773, 1976.
- YOUNES, Islem et al. New proteases extracted from red scorpionfish (*Scorpaena scrofa*) viscera: Characterization and application as a detergent additive and for shrimp waste deproteinization. **Food and Bioprocess Processing**, v. 94, p. 453-462, 2015.
- ZAIA, Dimas AM; ZAIA, Cássia Thaïs BV; LICHTIG, Jaim. Determinação de proteínas totais via espectrofotometria: vantagens e desvantagens dos métodos existentes. **Química nova**, v. 21, n. 6, p. 787-793, 1998.

ZHANG, Yi; HE, Shudong; SIMPSON, Benjamin K. Enzymes in food bioprocessing—novel food enzymes, applications, and related techniques. **Current opinion in food science**, v. 19, p. 30-35, 2018.

ZHAO et al. Enzymatic hydrolysis and their effects on conformational and functional properties of peanut protein isolate, **Food Chemistry**. v. 127, p. 1438–1443, 2011.

ZHAO, Jian and EE, Kah Yaw. Protease Inhibitors. **Encyclopedia of Food Chemistry**, p. 253-259, 2019.