

Volpe 23/03/94

Este Exemplar corresponde a Redação
Final da Tese, Defendida por Carmelita
Aparecida Basilio, e Aprovada pela Comissão
Julgadora.

I Q

dc
Extração, purificação, imobilização, estudo
cinético e calorimétrico das enzimas
proteolíticas presentes no látex do mamoeiro.

Carmelita Aparecida Basilio. ²⁺

Orientador: Prof. Dr. Pedro L. O. Volpe. ⁺

Tese de Doutorado.

Aos meus pais, irmãos
e minhas avós;
"in memoria"
Dedico.

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Pedro Luis Onofrio Volpe agradeço a orientação , a amizade e a oportunidade para realização deste trabalho.

A Profa. Dra. Lucia Pereira-da-Silva agradeço a co-orientação dedicada a parte de bioquímica deste trabalho.

Ao Prof. Dr. Yoshitaka Gushiken e a Dra. Margarida agradeço a infra estrutura cedida para a realização dos experimentos com enzimas imobilizadas sem a qual não teria sido possível a realização desta etapa do trabalho.

Ao Prof. Dr. Nelson Duran e ao Sr. Francisco (Chico) agradeço as determinações dos aminoácidos da caseína.

A Profa Dra Nilce Meirelles agradeço o uso da centrífuga refrigerada.

A Prof. Dra Cecilia Laluce -UNESP- Araraquara agradeço a oportunidade de realização da eletroforese em gel de poliacrilamida.

A Prof. Eleonora Carmona -UNESP- Rio Claro agradeço o empréstimo do banho com agitação para a realização da cinética enzimáticas com enzimas imobilizadas.

Ao Instituto de Química da -UNICAMP - agradeço a oportunidade para a realização deste trabalho.

A Srta. Cássia agradeço a sua dedicação para a realização dos experimentos realizados com DSC.

A Sra. Delma agradeço a realização dos espectros infra-vermelho e a sua amizade durante estes anos .

A Srta. Cláudia agradeço a ajuda na realização dos experimentos de cinética enzimática com substratos sintéticos.

A Sra. Elite agradeço sua amizade e compreensão durante estes anos.

Ao colega Watson Loh agradeço a ajuda nos experimentos diários, e a sua colaboração na discussão deste trabalho.

Aos colegas do laboratório Alexandre, Amélia, Carmem, Claudio, Eloi, Ligia, Silvia e Watson, e também os colegas do laboratório de organometálicos agradeço o agradável convívio.

A Wallarstein do Brasil em especial ao Sr. Julio agradeço o látex de mamoeiro seco fornecido para a realização deste trabalho.

Ao CNPQ pela ajuda financeira.

Ao FAEP pelo financiamento deste projeto de tese

A todos que direta ou indiretamente contribuíram para a realização deste trabalho.

ÍNDICE GERAL

Agradecimentos	iii
Abreviações utilizadas neste trabalho	xiv
Resumo	xvi
Abstract	xvii
I. AS ENZIMAS PROTEOLÍTICAS PRESENTES NO LÁTEX DE <i>Carica papaya</i>.	
I.1. Introdução	1
I.2. Histórico	2
I.3. Classificação e Nomenclatura	4
I.4. Mecanismo de Ação das Cisteínas-Proteases	5
I-5. Especificidade das Proteases	6
II. IMOBILIZAÇÃO DE ENZIMAS.	
II.1. Introdução	7
II.2. Histórico	7
II.3. Características das Enzimas Imobilizadas	8
II.4. Método de Imobilização	8
II.4.1. Imobilização por Inclusão	9
II.4.1.1. Inclusão em Matriz Insolúvel em Água	9
II.4.1.2. Microencapsulamento	9
II.4.2. Imobilização por Adsorção	10
II.4.3. Imobilização por Ligação Cruzada	10
II.4.4. Imobilização por Ligação Covalente	10
III. A Energia Envolvida na Mudança Conformacional da Enzima.	
III.1. Introdução	12

III.2. Histórico	12
III.3. A Importância da Água na Conformação das Proteínas	15
III.4. Forças Envolvidas na Conformação Nativa das Proteínas	15
III.4.1. Forças Eletrostáticas.....	16
III.4.2. Forças de van der Waals.....	17
III.4.3. Ligações por Pontes de Hidrogênio	17
III.4.4. Interações Hidrofóbicas	19
III.5. Aspectos Cinéticos do Enrolamento das Proteínas	19
IV. A Aplicação da Calorimetria no Estudo de Sitemas de Natureza Biológica.	
IV. Introdução	21
IV. Histórico	22
V. Objetivos	23
VI. Parte Experimental	24
VI.1. Extração das Enzimas do Látex Seco.....	24
VI.2. Preparação da resina de CM-Celulose.....	24
VI.3. Isolamento Cromatográfico dos Componentes Proteicos do Látex do Mamoeiro.....	24
VI.4. Purificação da Papaina	25
VI.4.1. Fracionamento com Sulfato de Amônio 45%	25
VI.4.2. Fracionamento com Sulfato de Amônio 40%	25
VI.4.3. Fracionamento com Cloreto de Sódio	25
VI.4.4. Cristalização	26
VI.5. Eletroforese em Gel de Poliacrilamida	26
VI.5.1. Preparação das Amostras	26

VI.5.2. Fixação, Coloração e Descoloração dos Geis	27
VI.6. Eletroforese em Gel de Poliacrilamida na Presença de SDS	
267	
VI.6.1. Preparação da Amostra	27
VI.6.2. Coloração com Prata	27
VI.7. Dosagem de Proteínas	28
VI.7.1. Preparação do Reagente de Fenol	28
VI.7.2. Método de LOWRY	28
VI.7.3. Medidas da Absorbância a 280 nm	28
VI.8. Cinética Enzimática	28
VI.8.1. Substratos: Caseína Tipo Hammrsten, Caseína N,N'-Dimetilada	29
VI.8.2. Substrato BAEE	29
VI.8.3. Substrato Z-ala-pNP	30
VI.9. Tratamento dos dados Cinéticos	31
VI.10. Ativação e Funcionalização de Micro Esferas de Sílica Gel para a Imobilização das Enzimas	31
VI.11. Imobilização das Enzimas Proteolíticas na Sílica Gel	31
VI.12. Cinética Enzimática das Enzimas Imobilizadas em Sílica Gel	32
VI.13. Estabilidade das Enzimas Proteolíticas do Látex de <i>Carica papaya</i> Imobilizadas em Função do tempo	33
VI.14. Estabilidade das Enzimas Proteolíticas	33
VI.15. Determinação da Variação da Entalpia de Desnaturações das Enzimas ΔH_{DESN} ..	34

VI.16. Determinação da Variação da Entalpia de Desnaturação das Enzimas Imobilizadas	34
VI.17. O Modelo de Dois Estados para a Desnaturação-Aspectos Cinéticos e Termodinâmicos	34
VI.18. Cálculos da Relação $\Delta H_{\text{vanT Hoff}} / \Delta H_{\text{DESN}}$	36
VI.19. Atividade das Enzimas Proteolíticas em Função do Tempo.....	36
VI.20. Determinação da Variação de Entalpia de Proteólise ΔH_{PROT}	36
VI.21. Análise dos Termogramas.....	37
VII.RESULTADOS	39
VII.1. Análise do látex por Eletroforese em Gel de Poliacrilamida.	39
VII.2. Critérios de Pureza.	40
VII.3. Rendimento e Atividade Específica.....	41
VII.4. Análise Cromatográfica e Eletroforética do Látex do Mamoeiro.	42
VII.5. Análise de Purificação da Papaína.	44
VII.6. Caracterização Cinética das Proteases do Látex.	44
VII.6.1. Atividade Esterolítica.	44
VII.7.2. Atividade Proteolítica.	46
VII.7. Controle da Caseína N,N'-Dimetilada.	52
VII.8. pH Ótimo das Proteases Imobilizadas.....	52
VII.9. Cinética Enzimática das Enzimas Imobilizadas.....	52
VII.10. Estabilidade das Proteases do Látex do Mamoeiro Imobilizadas em Função do Tempo.	60

VII.11. Estabilidade das Proteases do Látex do Mamoeiro em Solução em Função do Tempo	60
VII.12. Variação da Entalpia de Desnaturação ΔH_{DESN}	61
VII.13. Cálculos da Relação de $\Delta H_{\text{vanT Hoff}} / \Delta H_{\text{DESN}}$	67
VII.14. Atividades das Enzimas Proteolíticas em Função da Temperatura	69
VII.15. Variação da Entalpia de Proteólise ΔH_{PROT}	70
VII.16. Eletroforese em Gel de Poliacrilamida em Sistema Desnaturante dos Peptídeos Obtidos Após a Proteólise.	71
VIII. DISCUSSÃO	73
VIII.1. Purificação da Quimopapaína B e Papaya Proteinase.	73
VIII.2. Purificação da Papaína	74
VIII.3. Caracterização Cinética das Proteases do Látex do Mamoeiro	74
VIII.3.1. Reação Proteolítica	74
VIII.3.2. Reação Esterolítica	75
VIII.3.3. Cinética Enzimática das Enzimas Imobilizadas	76
VIII.4. Estabilidade das Proteases do Látex do Mamoeiro	76
VIII.5. Variação da Entalpia de Desnaturação das Proteases	78
VIII.6. Atividade das Proteases em Função do Tempo	82
VIII.7. Estudo Calorimétrico da reação Enzima-Substrato Entalpia de Proteólise ΔH_{PROT} ..	83
IX. CONCLUSÃO	87
X. REFERÊNCIAS BIBLIOGRAFICAS	89

ÍNDICE DAS TABELAS

TABELA I. Exemplos de Pontes de Hidrogênio que Podem ser Formadas por Resíduos de Aminoácidos Polares.....	17
TABELA II. Identificação das Bandas Eletroforéticas das Proteínas Constituintes do látex de <i>Carica papaya</i> em Gel de Poliacrilamida.39	
TABELA III. Purificação da Quimopapaína B e Papaya Proteinase a Partir de 30g do Látex de mamoeiro seco.	42
TABELA IV. Purificação da Papaína a Partir de 30 g do Látex de Mamoeiro Seco.	42
TABELA V. Resultados Eletroforéticos das Proteases Presentes no látex do Mamoeiro Eluidos por Tampão Acetato de Sódio pH 5,0 com Concentrações Crescentes em Coluna Contendo CM-Celulose.....	43
TABELA VI. Parâmetros Cinéticos das Enzimas Proteolíticas Presentes no Látex de <i>Carica papaya</i>	59
TABELA VII. Parâmetros Termodinâmicos de Desnaturação das Proteases.	67
TABELA VIII. Cálculos da Relação $\Delta H_{van'T Hoff} / \Delta H_{DESN}$ para as Enzimas Papaína, Quimopapaína B e Papaya Proteinase.	68
TABELA IX. Variação da Entalpia de Proteólise.	70
TABELA X. Papaína Ligada aos Suportes por Diferentes Método	77
TABELA XI. Resumo dos Parâmetros da Estabilidade da Papaína Imobilizada.....	78

TABELA XII. Comparação da Sequência de Aminoácidos que Compõe: Papaína, Quimopapaína B e Papaya Proteinase.	79
TABELA XIII. Entalpia de Hidrólise de Peptídeos a 25 °C	84

ÍNDICE DAS FIGURAS.

FIGURA 1. Classificação das Proteases.....	4
FIGURA 2. Mecanismo Geral de Ação das Cisteínas-Proteases.....	6
FIGURA 3. Cluster de Moléculas de Água.....	15
FIGURA 4. As forças Envolvidas no Enrolamento das Proteínas.....	16
FIGURA 5. Equilíbrio entre N-dimetilacetamida e seu Dímero por Ponte de Hidrogênio. .	18
FIGURA 6. Mecanismo de Funcionalização das Microesferas de Vidro e Imobilização das Proteases.	32
FIGURA 7. Esquema da Cella de Perfusão do Tipo Batelada.	37
FIGURA 8. Eletroforese em Gel de Poliacrilamida do Látex do Mamoeiro.	39
FIGURA 9 . Eletroforese em Gel de Poliacrilamida do Material Eluído em CM-Celulose de acordo com os picos da Figura 11.	40
FIGURA 10. Eletroforese em Gel de Poliacrilamida do Material Proveniente da Purificação da Papaína.	41
FIGURA 11. Cromatografia em CM-Celulose do Látex do Mamoeiro.	43
FIGURA 12. Atividade Enzimática Em Função da Força Iônica.	44
FIGURA 13. Atividade Esterolítica Apresentada pelas Proteases do Látex.	45
FIGURA 14. Curva de Saturação das Enzimas Papaína e Quimopapaína B pelo Substrato Caseína N,N'-Dimetilada segundo Michaelis-Menten.	47
FIGURA 15. Curva de Saturação da enzima Papaya Proteinase pelo Substrato Caseína N,N'-Dimetilada Segundo Michaelis-Menten.	48
FIGURA 16. Gráfico Construído Segundo o Tratamento de HANES para a papaína utilizando-se como Substrato a Caseína N,N'-Dimetilada.	49

FIGURA 17. Gráfico Construído Segundo o Tratamento de HANES para a quimopapaína B Utilizando-se como Substrato a Caseína N,N'-Dimetilada.	50
FIGURA 18. Gráfico Construído Segundo o Tratamento de HANES para a Papaya Proteinase Utilizando-se como Substrato a Caseína N,N'-Dimetilada.	51
FIGURA 19. Atividade Proteolítica Apresentada pelas Proteases do Látex Imobilizadas em Função do pH.	52
FIGURA 20. Curva de Saturação da Enzima Papaína Imobilizada Segundo o Comportamento de Michaelis-Menten pelo Substrato Caseína N,N'-Dimetilada a 1%.	54
FIGURA 21. Curva de Saturação das Enzimas Quimopapaína B e Papaya Proteinase Segundo o Comportamento de Michaelis-Menten Utilizando-se a Caseína N,N'-Dimetilada a 1%.	55
FIGURA 22. Gráfico Construído Segundo o Tratamento de HANES para a Papaína Imobilizada Sob Sílica Gel Usando como Substrato a Caseína N,N'-Dimetilada a 1%.	56
FIGURA 23. Gráfico Construído Segundo o Tratamento de HANES para a Quimopapaína B Imobilizada Sob Sílica Gel Usando-se como Substrato a Caseína N,N'-Dimetilada a 1%.	57
FIGURA 24. Gráfico Construído Segundo o Tratamento de HANES para Papaya Proteinase Imobilizada sob Sílica Gel Usando Como Substrato a Caseína N,N'-Dimetilada a 1%.	58
FIGURA 25. Determinação da Atividade das Enzimas Imobilizadas.	60
FIGURA 26. Estabilidade das Proteases em Função do Tempo.	61
FIGURA 27. DSC das Proteases do Látex em pH 7,0.	63
FIGURA 28. DSC das Proteases do Látex em pH 3,0.	64

FIGURA 29. DSC da Sílica Gel.....	65
FIGURA 30. DSC das Enzimas Imobilizadas em pH 7,0.....	66
FIGURA 31. Ln Kapp em Função do Inverso do Temperatura.....	68
FIGURA 32. Atividade das Enzimas Proteolíticas a 37 °C em Função do Tempo.....	69
FIGURA 33. Termograma da Titulação Microcalorimétrica da Proteases.....	70
FIGURA 34. Titulação Microcalorimétrica das Proteases.....	70
FIGURA 35. Eletroforese em Gel de Poliacrilamida em SDS do Material de Proteólise obtido Após a Adição de TCA a 5% e Filtrado.....	72
FIGURA 36. Domínios da Papaína.....	80
FIGURA 37. Eletroforese em Gel de Poliacrilamida em SDS para controle da Caseína N,N'-Dimetilada. Apêndice	
FIGURA 38. Espectro Infra Vermelho da Caseína N,N'-Dimetilada da Sigma. Apêndice	
FIGURA 39. Espectro Infra Vermelho da Caseína N,N"-Dimetilada Sintetizada em Nosso Laboratório. Apêndice	
FIGURA 40. Espectrofotometria de RMN da Caseína N, N'-Dimetilada da Sigma Apêndice	
FIGURA 41. Espectrofotometria de RMN da Caseína N,N'-Dimetilada Sintetizada em Nosso laboratório. Apêndice	
FIGURA 42. Determinação dos Aminoácidos da Caseína N, N'-Dimetilada da Sigma Apêndice	
FIGURA 43. Determinação dos Aminoácidos da Caseína N, N'-Dimetilada Sintetizada em Nosso laboratório. Apêndice	

ABREVIATURAS UTILIZADAS NESTE TRABALHO

EDTA	Ácido Etileno Diaminotrácetico.
TCA	Ácido Tricloro Acético.
SDS	Dodecil Sulfato de Sódio.
DTT	Dititreitól
BAEE	Benzoil Arginina Etil Éster
Z-ala-pNP	N-Carbobenzoxil-ala-paranitrofenol Éster.
DSC	Calorimétria de Varredura Diferencial.
K_M	Constante de Michaleis-Menten
V_{max}	Velocidade Máxima
K_{cat}	Constante de Catálise
ΔH_{PROT}	Varição de Entalpia de Proteólise
ΔH_{DESN}	Varição de Entalpia de Desnaturação
$\Delta H_{van'T Hoff}$	Varição de Entalpia de van' T Hoff
K_{cat}	Constante de Catálise
CM-Celulose	Carboxi Metil Celulose

ABREVIÇÕES DOS AMINOÁCIDOS

AMINOÁCIDO	ABREVIÇÃO DE TRÊS LETRAS	ABREVIÇÃO DE UMA LETRA
Alanina	Ala	A
Arginina	Arg	R
Asparagina	Asn	N
Ácido aspártico	Asp	D
Ácido glutâmico	Glu	E
Cisteína	Cys	C
Glicina	Gly	G
Glutamina	Gln	Q
Histidina	His	H
Isoleucina	Ile	I
Leucina	Leu	L
Lisina	Lys	K
Metionina	Met	M
Fenilalanina	Phe	F
Prolina	Pro	P
Serina	Ser	S
Tirosina	Tyr	Y
Treonina	Thr	T
Triptofano	Trp	W
Valina	Val	V

RESUMO

As enzimas papaína, quimopapaína B e papaya proteinase foram extraídas e purificadas a partir do látex seco de *Carica papaya*. O método desenvolvido neste trabalho para a purificação das enzimas proteolíticas mostrou ser possível a separação das mesmas em um único passo, utilizando gradiente de força iônica crescente com tampão acetato de sódio pH 5,0.

As proteases livres e imobilizadas foram utilizadas para estudos cinéticos e calorimétricos utilizando substratos sintéticos e proteicos. A imobilização em sílica funcionalizada mostrou ser muito eficiente mantendo a atividade enzimática por vários meses.

Papaína e quimopapaína B apresentaram maior afinidade pelos substratos proteicos do que a papaya proteinase. Para as enzimas imobilizadas a papaína apresentou maior afinidade pelo substrato do que as outras proteases.

Estudos calorimétricos mostraram que as enzimas quimopapaína B e papaya proteinase são termicamente reversíveis e que a desnaturação destas enzimas obedece um modelo de transição de dois estados. Confirmou-se a existência de estados intermediários de desnaturação para a papaína. Foram determinados os valores da entalpia de desnaturação, ΔH_{DESN} , para as proteases, assim como a razão $\Delta H_{\text{VANTHOFF}} / \Delta H_{\text{DENS}}$.

Apesar das enzimas terem uma estrutura primária muito semelhante a variação de entalpia de proteólise ΔH_{PROT} é muito diferente.

ABSTRACT

The enzymes papain, chymopapain and papaya proteinase were extracted and purified from dried latex of *Carica papaya*. The method developed in this work for the purification of the proteolytic enzymes has shown to allow the separation of the enzymes in only one step by using increasing gradient concentration of the buffer

The immobilized and dissolved enzyme were used for kinetics and calorimetric studies with synthetic and proteic substrates. Immobilization on glass spheres has shown to be very efficient keeping the enzymatic activity for several months.

Papain and chymopapain showed higher affinity for the substrates proteic than for papaya proteinase. With the immobilized enzymes, papain showed bigger affinity for the substrate than for the others proteases.

Calorimetric studies showed that the enzymes chymopapain and papaya proteinase are thermally reversible and the denaturation of these enzymes obeys the two-state transition model. The existence of intermediate states for the denaturation of papain was confirmed. The value for the enthalpy of denaturation ΔH_{DESN} of the proteases were determined as well as the ratio $\Delta H_{\text{vanT Hoff}} / \Delta H_{\text{DESN}}$. In spite of the similar primary structure of the enzymes, the enthalpy variation of proteolysis is very different.

I. AS ENZIMAS PROTEOLÍTICAS PRESENTES NO LÁTEX DE *Carica papaya*

I.1. INTRODUÇÃO

O mamoeiro (*Carica papaya*) é cultivado em quase todos os países tropicais do mundo. Os maiores produtores são: Índia, Ceilão, Malásia, América Central e do Sul, Sul da África e Havaí (1). A planta produz um fluido biológico que circula pelo tronco, folhas e frutos. Este fluido viscoso é denominado "látex de *Carica papaya*" ou simplesmente "látex".

Devido à sua atividade proteolítica o látex de *Carica papaya* tem um grande interesse por sua ampla aplicação no campo industrial. Entre suas principais aplicações destacam-se a clarificação da cerveja (correspondendo a 75% da demanda), o amaciamento da carne, a fabricação de produtos farmacêuticos, de alimentos pré-cozidos, de cosméticos e o processamento do couro em curtumes (2).

Entre os constituintes do látex do mamoeiro encontram-se várias enzimas, quais sejam: papaína, lisozima, quimopapaína A e B e papaya proteinase. Com exceção da lisozima, as demais são proteinases, grupo complexo de enzimas que apresentam uma grande variação em suas propriedades físico-químicas e catalíticas. Estas enzimas são produzidas intra e extracelularmente, exercendo importantes funções nos processos metabólicos das células animais e vegetais, bem como nos microrganismos procarióticos e eucarióticos (3).

As proteases extracelulares atuam, principalmente, na hidrólise de substratos proteicos, transformando-os em cadeias menores que podem ser subsequente absorvidas pelas células. As enzimas intracelulares estão relacionadas com o processo de regulação metabólica (4) e no "turnover" de proteínas (5).

Atualmente as enzimas proteolíticas apresentam uma expressiva importância econômica. A grande diversidade da ação proteolítica sobre moléculas de proteínas tem tornado essas enzimas essenciais ao processamento de alimentos, como carne e pão, à manufatura de detergentes, à indústria farmacêutica, ao diagnóstico de doenças e, ainda, à biotecnologia.

Mais recentemente na área médica, a quimopapaína tem sido utilizada no tratamento da hérnia de disco (6), a papaína na terapia de doenças digestivas (7), assim como na dissolução de cistos fibrosos benignos, celulites, edemas, inflamações, etc. (8).

1.2. HISTÓRICO

Em 1873, ROY (9) reconhecia a forte atividade proteolítica do látex como a responsável pelos usos culinários do mesmo, desenvolvidos por vários povos da região aonde o mamoeiro era conhecido. WURTZ e BOUCHET, (10), em 1879 desenvolveram as primeiras investigações a respeito da atividade proteolítica do látex do mamoeiro. O termo "papayne" foi atribuído por estes mesmos autores para descrever o princípio ativo presente no látex e responsável pela atividade proteolítica, passando o termo "papaína" a designar o material pulverulento obtido pelo dessecamento ao ar do látex de mamoeiro.

Historicamente, o primeiro látex comercial seco foi obtido expondo-se o látex ao sol (1). Este método produz uma papaína de baixa atividade proteolítica, colorida e com um odor desagradável devido à contaminação por microrganismos. Um outro método para obtenção da papaína é o "cross-flow", no qual o látex fresco, encontrado na forma de coágulo, deve ser agitado para a liquefação, podendo sofrer adição de até 0,5% de metabissulfito de sódio ou potássio, com a finalidade de estabilização. O látex liquefeito é, então, filtrado ou centrifugado para eliminação de impurezas grosseiras e colocado em bandejas, as quais são levadas a cabines, termostaticamente controladas e mantidas a 55°C. O produto obtido por tal procedimento apresenta-se como grânulos brancos, sendo de melhor qualidade do que aquele seco ao sol ou em estufas (11).

A papaína obtida pelo método "spray dried", descrito na patente britânica de número 1196760, apresenta as seguintes vantagens sobre os tipos anteriormente citados: esterilidade e solubilidade total do produto, maior atividade catalítica, e ausência de contaminantes (12).

VINER (13) sugeriu que a papaína poderia ser composta por mais de uma substância com atividade proteolítica, pois obteve duas frações por precipitação com cloreto de sódio. FRANKEL (14) também conseguiu a separação de componentes do látex, através da precipitação dos mesmos por meio de solventes orgânicos. As publicações de BALLS e LINEWEAVER (15 e 16) significaram um passo decisivo para a caracterização do látex como uma mistura de proteinases. Na primeira publicação foi descrito o isolamento no estado cristalino de uma enzima proteolítica, a qual os autores denominaram, simplesmente, de "papaína". Tal fato provoca até hoje sérias dificuldades conceituais, pois o látex seco, bruto ou purificado, também é conhecido universalmente pelo mesmo nome, ou seja, papaína. Para evitar confusão do termo, na presente tese, papaína refere-se sempre e tão-somente a enzima isolada do látex de mamoeiro, designada pela numeração EC.3.4.22.2 (17).

KIMMEL e SMITH (18) modificaram o procedimento de BALLS e LINEWEAVER (15) descrevendo um método de preparação da papaína cristalina a partir do látex seco, sendo esse, durante anos, o método padrão para a purificação da papaína. Esses mesmos pesquisadores (18) revisaram, extensivamente, as propriedades físico-químicas da papaína, destacando-se entre elas: a constituição por um único componente proteico, a baixa especificidade e a significativa presença de grupos "sulfidríla" que desempenham papel fundamental na sua atividade catalítica. Entretanto, o mecanismo de ação enzimática da papaína ainda não está, totalmente, elucidado (19).

BALLS e LINEWEAVER (16) reconheceram a existência de uma outra protease no látex, com menor atividade proteolítica, sendo denominada de "quimopapaína" por JANSEN e BALLS (20). Um contraste marcante entre a fração de papaína e a fração de quimopapaína do látex reside no fato desta última apresentar-se como uma mistura de proteínas muito semelhantes entre si. Isso tem gerado uma longa controvérsia sobre o número de enzimas com atividades presentes no látex, questão ainda não resolvida.

EBATA e YASUNOBU (21) introduziram o uso de resinas iônicas na resolução do látex e obtiveram uma enzima na forma cristalina, eletroforéticamente homogênea, na qual o ácido glutâmico constitui o resíduo amino terminal. Entretanto, KUNIMITSU e YASUNOBU (22) foram capazes de isolar uma protease a partir da fração de quimopapaína obtida pelo método de EBATA e YASUNOBU (21). Tal protease se apresenta com uma maior atividade proteolítica sobre o substrato caseína, tendo como resíduo amino terminal a tirosina. Foi, então, proposta a existência de duas quimopapaínas que foram denominadas de A e B, segundo sua ordem de descoberta e, também, de conformidade com a maior carga positiva. Entretanto, desde então, tem sido colocada em dúvida a correção desta proposição. Alguns autores julgam existir mais de dois componentes (KUNIMITSU e YASUNOBU (22), LYNN (23 e 24), JOSHI et alii (25) e CLAGETTE et alii (26)), outros admitem a existência de apenas um BUTTLE e BARRET (27), KHAN e POLGÁR (28), KÓRÓDI et alii (29) e CAYLE et alii (30).

A papaya proteinase é a protease mais básica do látex do mamoeiro e foi descrita pela primeira vez por SHACK (31), que a denominou de "papaya peptidase". Recentemente, proposições baseadas em argumentos diversificados, como por exemplo, o fato da papaya peptidase não ser uma peptidase e sim, uma protease, questionam esta denominação. Foram sugeridos vários nomes por diversos autores, a saber: "papaya proteinase omega" por BROCKLEHURST et alii (32); papaya proteinase III por POLGÁR (33) e papaya

proteínase por BARRET e MACDONALD (34). Nesse trabalho, adotamos esta última denominação, isto é, "papaya proteínase".

Comentamos, anteriormente, a existência de um único componente protéico do látex quantitativamente importante, que não é uma protease, a lisozima, que tem um importante papel de defesa da planta contra agressões das mais variadas formas vivas. Muito embora sua função seja relevante, a lisozima do látex tem recebido pouca atenção dos pesquisadores.

1.3. CLASSIFICAÇÃO E NOMENCLATURA

Proteases são hidrolases, isto é, enzimas que quebram ligações peptídicas com a adição de água, estando classificadas na categoria EC 3.4 de acordo com a União Internacional de Bioquímica (35).

Embora os termos proteases e proteínases sejam freqüentemente usados para referir-se às enzimas proteolíticas, o último é o mais restrito, como ilustra a Figura 1. O termo proteínase é aplicado somente para proteases do tipo endopeptidase.

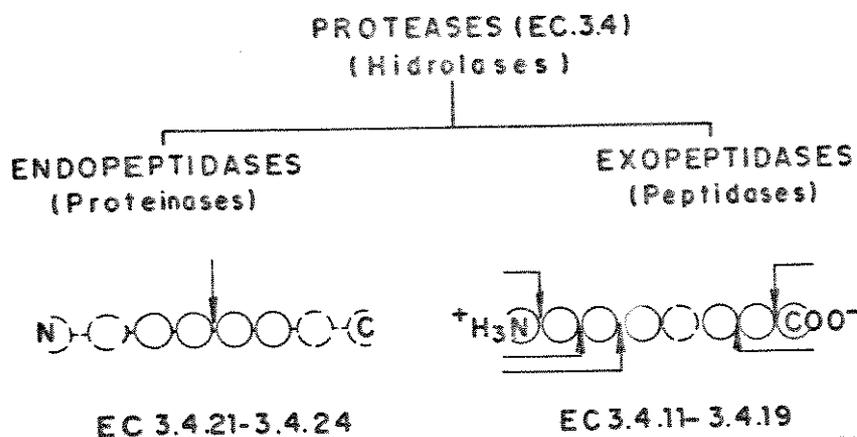


FIGURA 1. Classificação das proteases

Endopeptidases, que catalisam a hidrólise das ligações internas na cadeia polipeptídicas

Exopeptidases que atacam somente ligações peptídicas localizadas nas extremidades das cadeias

(36).

Os termos, quais sejam, papaína, quimopapaína, quimotripsina, dentre outros, são ainda utilizados por muitos pesquisadores, para várias enzimas desta classe, embora exista uma nomenclatura oficial proposta por HARTELY (37) em 1960.

As endopeptidases contêm sítios específicos que, normalmente, não aceitam substratos com grupos terminais amino ou carboxila carregados, sendo classificadas de acordo com o grupo funcional de seu sítio em: serina-proteases, cisteína-proteases, aspártico-proteases, e metalo-proteases. Existem, portanto, quatro mecanismos catalíticos básicos para as endopeptidases, que são facilmente distinguidos pela sensibilidade a inibidores específicos. Para a determinação do mecanismo catalítico, o estudo dos inibidores é mais importante do que a especificidade (38, 39 e 40). As enzimas proteolíticas do látex do mamoeiro são classificadas como cisteína-proteases por apresentarem o resíduo de cisteína-25, essencial ao seu mecanismo de ação.

1.4. MECANISMO DE AÇÃO DAS CISTEÍNAS-PROTEASES

A reação catalisada por essas enzimas é a hidrólise das ligações peptídicas de proteínas e peptídeos. Entretanto, elas são também capazes de hidrolizar um grande número de substratos sintéticos, como amidas e ésteres.

Estas proteases são também completamente inativadas por reagentes bloqueadores do grupo tiol, tais como: ácido iodoacético, ácido para-mercuribenzoico, metais pesados, etc.

O mecanismo de ação das cisteína-proteases resulta da reação de um substrato com o grupo sulfidril, presente em um resíduo de cisteína do sítio ativo. Na papaína, o grupo imidazólico não protonado da His-137 aumenta a reatividade da cys-25 por atrair o átomo de hidrogênio do seu grupo tiol, elevando a densidade eletrônica do átomo de enxofre (41, 42 e 43). Esse átomo de enxofre da cisteína ataca o grupo carbonila do substrato, formando um composto tetraédrico, qual seja, o intermediário estável acil-enzima que apresenta ligações covalentes, conforme o esquematizado na Figura 2 (etapa de acilação). Para quebrar o complexo acil-enzima, tem sido sugerido que o grupo imidazol da histidina, carregado positivamente, atrai o grupo hidroxil da água e este atua como um nucleófilo, quebrando a ligação éster do complexo intermediário enzima-substrato (etapa de desacilação). Esta hidrólise propicia a formação do produto e o retorno da enzima para sua forma original (44, 45 e 46).

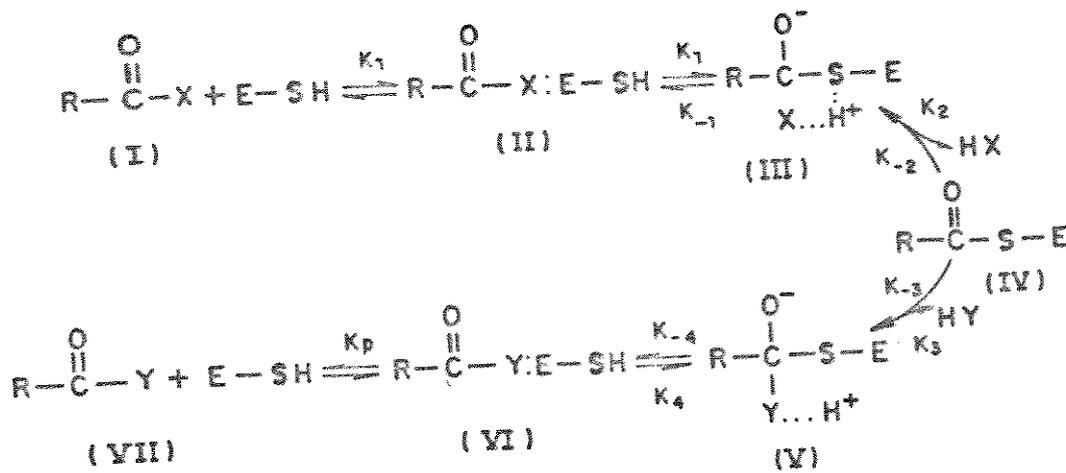


FIGURA 2. Mecanismo geral de ação da cisteína-protease (47).

1.5. ESPECIFICIDADE DAS PROTEASES

Quanto ao tipo de ligação peptídica suscetível à clivagem, a especificidade das enzimas proteolíticas do látex de *Carica papaya* varia amplamente. Embora existam numerosos estudos voltados à elucidação das cisteínas proteinases, até o presente momento tal assunto ainda não foi totalmente esclarecido (48).

FRUTON (49) estudou, sistematicamente, a especificidade da papaína por meio de substratos proteicos. Este autor comenta que existe uma série de dificuldades para se esclarecer a especificidade da papaína, destacando-se dentre elas: a extensão do sítio ativo e a sua interação em múltiplos pontos do substrato, tendo como conseqüência um processo cooperativo.

Na literatura a quimopapaína e a papaya proteinase são, geralmente, descritas como enzimas que apresentam uma especificidade mais restrita do que a papaína.

JACQUET et alii (50) sugeriram que estas enzimas proteolíticas apresentam diferentes especificidades distintas entre si, devido à diferentes composições de aminoácidos ao redor do sítio ativo, diferenças essas relacionadas às suas diferentes formas estruturais e propriedades físico químicas. Assim, a papaína cliva principalmente as ligações peptídicas anterior e posterior a serina; cliva as ligações lis-ala; quimopapaína cliva preferencialmente as ligações peptídicas anteriores e posteriores a aminoácidos aromáticos; papaya proteinase cliva as ligações anteriores e ou posteriores a aminoácidos aromáticos e glicina.

II. IMOBILIZAÇÃO DE ENZIMAS

II.1. INTRODUÇÃO

As enzimas são muito atrativas para a indústria devido a sua extraordinária especificidade, poder catalítico e a vantagem de poder operar a baixa temperatura (51). Entretanto, o uso das enzimas em processos industriais é restrito. Primeiro, por seu caráter proteico, uma vez que as enzimas podem manter sua atividade ótima em uma faixa limitada de condições, e segundo, pelo fato das enzimas apresentarem catálise homogênea, sendo geralmente diluídas em soluções aquosas, e desprezadas após o uso, por perderem a atividade ou por não poderem ser recuperadas (51).

O processo de imobilização oferece uma possível solução para estes problemas. Pela associação da enzima a um suporte sólido insolúvel, com dimensões que permitem que a reação enzima-substrato ocorra, num sistema de catálise heterogênea, torna-se possível sua utilização inúmeras vezes em batelada ou processo contínuo.

II.2. HISTÓRICO

A primeira comunicação sobre imobilização de uma enzima foi feita em 1916, quando NELSON e GRIFFIN (52) adsorveram a invertase em carvão e mostraram que a enzima mantinha sua atividade, podendo ser utilizada várias vezes.

Durante quase quarenta anos praticamente nada foi acrescentado a pesquisa de processos de imobilização de enzimas. Em 1954 GRUHOFER e SCHEITH (53) imobilizaram amilase, pepsina e outras enzimas em poliacrilamida mostrando que elas mantinham suas atividades. No início dos anos sessenta as pesquisas sobre imobilização foram intensificadas. BAR-ELI e KATCHALSKI (54) imobilizaram a enzima tripsina e demonstraram que esta apresenta aproximadamente 20% da sua atividade na forma livre. Portanto, a imobilização apresentou a vantagem de aumentar a estabilidade, podendo-se estocar a enzima por um período de meses, sem perda significativa da atividade.

Em 1968, uma nova forma de imobilização de enzimas tornou-se comercialmente viável. Quimotripsina, papaína e tripsina foram comercialmente imobilizadas em polímeros. Desde então, as pesquisas

sobre imobilização foram intensificadas, assim como a das enzimas aplicado à química analítica (55 e 56); análises clínicas (57) e a estudos de imobilização em colunas (58).

II.3. CARACTERÍSTICAS DAS ENZIMAS IMOBILIZADAS

Quando uma enzima é imobilizada algumas de suas características físico-químicas sofrem modificações.

- 1) pH ótimo - Devido à modificação no microambiente interações eletrostática, ligações de hidrogênio, entre outras, afetam o pH ótimo de atividade enzimática. Desta maneira, o pH ótimo pode sofrer alterações de mais ou menos duas unidades.
- 2) Alteração na constante de Michaelis-Menten - Geralmente ocorre um aumento de K_M , devido ao fato da reação apresentar uma catálise heterogênea, dificultando o processo de difusão e apresentando também modificações da estrutura tridimensional, que favorecem a catálise.
- 3) Reutilização - O processo de imobilização das enzimas permite que esta possa ser reutilizada várias vezes.
- 4) Maior Estabilidade - Qualquer processo de imobilização propicia reações que modificam as propriedades físico-químicas, aproximando as enzimas da situação real dentro das células. Desta maneira, as enzimas passam a ter maior estabilidade, maior precisão, atuam numa faixa mais ampla de pH e temperatura, tornando possível o uso na indústria.
- 5) Menor Interferência - As enzimas imobilizadas apresentam menor suscetibilidade à ação de ativadores e inibidores do que as enzimas livres em solução.

II.4. MÉTODO DE IMOBILIZAÇÃO

As enzimas são proteínas, portanto, os métodos de imobilização devem ser brandos, utilizando uma faixa restrita de pH e temperatura.

Nos últimos anos, ocorreram avanços consideráveis na tecnologia de imobilização de enzimas. Entre eles podemos destacar: modificações químicas das moléculas, por introdução de um grupo insolúvel e o aprisionamento da enzima em uma matriz inerte, como amido ou gel de poliacrilamida.

As técnicas de imobilização de enzima e derivados são: (1) imobilização por inclusão; (2) adsorção; (3) imobilização por ligação covalente; (4) imobilização por ligação covalente cruzada.

II.4.1. Imobilização por Inclusão

É um processo de imobilização que mantém as moléculas de enzimas aprisionadas dentro de uma rede tridimensional de um polímero insolúvel na água ou aprisionadas dentro de microcápsulas que são delimitadas por membranas semi-permeáveis, que possuem poros com dimensões dos produtos da reação (59).

Esta técnica de imobilização impõem mínima restrição às enzimas imobilizadas e não envolve ligação covalente para suportar a enzima, o que a torna vantajosa para imobilização de qualquer enzima (60).

II.4.1.1. Inclusão em Matrizes Insolúveis em Água

Neste caso, a enzima é dissolvida numa solução de um monômero, polimerizada na presença de um agente catalizador, podendo também ser aprisionada em um colóide protetor como albumina, agarose ou dextrana, ou ainda pode ser aprisionada dentro de fibras ocas. Deve-se evitar processos de polimerização exotérmicos devendo-se tomar cuidados adicionais para não desnaturar a enzima (61).

O polímero mais usado nesses processos é o de poliacrilamida, uma vez que as preparações de gel hidratado para eletroforese usando-se acrilamida e N, N' metilbisacrilamida é uma técnica rotineira nos laboratórios de bioquímica. Esta técnica apresenta a vantagem de não ser exotérmica (62).

Alguns plastificantes podem ser usados com o propósito de tornar o polímero menos rígido à temperatura ambiente. Podemos citar como principal vantagem deste tipo de imobilização o fato da enzima não envolver seus grupos ativos, com a totalidade da massa proteica sendo mantida dentro da rede do polímero.

II.4.1.2. Microencapsulamento

Foi CHANG (64) quem introduziu a técnica de microencapsulamento para enzimas imobilizadas. Neste procedimento a enzima fica dentro de uma cápsula limitada por uma membrana semi-permeável permanente ou por uma membrana semi-permeável não permanente. As membranas permanentes podem ser obtidas por coacervados de polímeros, com posterior polimerização interfacial.

Usando-se uma solução aquosa de enzima, um solvente orgânico insolúvel em água e a adição de dois monômeros, um hidrofílico e um hidrofóbico respectivamente, pode-se obter uma reação de polimerização que produz a formação de uma membrana ao redor das microgotículas. A maior desvantagem desta técnica consiste no fato de que o procedimento de polimerização pode causar a desativação da enzima.

II.4.2. Imobilização por Adsorção

A adsorção das enzimas sobre um suporte insolúvel resulta de ligações iônicas, ligações por pontes de hidrogênio, interações hidrofóbicas (van der Waals).

Os suportes que têm sido preferencialmente usados são vidro (65); quartzo (66); carvão (67); sílica gel (68); alumina (69); resina trocadora de íons (70) e bentonita (71).

Os suportes podem ser de dois tipos: porosos e não porosos, sendo que as enzimas ficam fracamente ligadas aos não porosos, enquanto que nos suportes porosos as proteínas preenchem seus poros.

A maior vantagem deste método é sua extrema simplicidade. A ligação da enzima como suporte é feita por simples exposição, e as condições são brandas mas a desvantagem é que esta metodologia depende de fatores tais como: pH, solventes, substratos e temperatura. Variando-se estes fatores pode ocorrer uma dessorção progressiva das enzimas. Estes inconvenientes limitam o emprego dessa técnica de imobilização (72).

II.4.3. Imobilização por Ligação Covalente

Este tipo de imobilização, em suporte insolúvel, caracteriza-se pela formação de uma ligação covalente dos grupos funcionais não ativos da enzima a grupos reativos ligados na superfície sólida do suporte.

Os suportes são escolhidos por suas propriedades de solubilidade, grupos funcionais, estabilidade mecânica e área superficial. Os suportes insolúveis mais usados incluem polímeros sintéticos (celulose, agar-agar, sefrose, colágeno, amido, dextrana, etc...) e materiais inorgânicos (óxidos metálicos e pérolas de vidro com propriedades conhecidas).

II.4.4. Imobilização por Ligação Cruzada

Reagentes bifuncionais (homofuncionais ou heterofuncionais) têm sido utilizados com grande frequência na imobilização de enzimas e ou proteínas. Este método baseia-se na formação de ligação das

moléculas de enzimas entre si por pontes intermoleculares, utilizando-se agentes homofuncionais ou heterofuncionais. Desta forma, obtém-se uma estrutura de alto peso molecular.

Alguns dos reagentes homofuncionais utilizados incluem: glutaraldeído, ácido 2,2' dissulfônico; enquanto que os heterofuncionais incluem o 3-metoxidifenilmetano, 4,4' diisocianato entre outros.

Esta técnica produz complexos de alta atividade e confere boa estabilidade frente às variações de pH, força iônica, solventes e temperatura.

III. A ENERGIA ENVOLVIDA NA MUDANÇA CONFORMACIONAL DA ENZIMA

III.1. INTRODUÇÃO

Um dos mais fascinantes e desafiadores problemas da bioquímica é aquele que se refere à base física da notável organização e especificidade estruturais das enzimas. Este problema tem um significado importante e particular, porque a atividade biológica dessas macromoléculas dependem das variações conformacionais da estrutura tridimensional (73).

Vários e complexos são os fatores que determinam a conformação da proteína na cadeia polipeptídica: o comprimento das ligações e os ângulos são considerados relativamente fixos, as ligações amídicas geralmente são planares, apresentando a conformação trans. Portanto a conformação da cadeia polipeptídica é especificada pelos valores adotados pelos ângulos de rotação internos ϕ e Ψ associados com cada resíduo (74). As rotações das ligações são limitadas por determinados fatores tais como: impedimento estérico e outras interações. Ligações por pontes de hidrogênio, interações hidrofóbicas (as quais surgem em consequência das características peculiares da água); interações eletrostáticas e ligações dissulfeto são determinantes da conformação do polipeptídeo. O conjunto de todos esses efeitos dá origem à conformação nativa das proteínas (75).

O estudo da variação de entalpia de desenrolamento (desnaturação) das proteínas é de fundamental importância para compreensão desses fatores.

A desnaturação tem sido tratada na literatura como um processo cooperativo (76). Entretanto as medidas termodinâmicas da mudança conformacional são interpretadas como um modelo em dois estados: nativo e desnaturado, envolvendo respectivamente a estrutura nativa e desnaturada das proteínas.

III.2. HISTÓRICO

COHN (77) iniciou o estudo das propriedades termodinâmicas das proteínas, observando o efeito de sais na solubilidade e as interações destes sais com pequenas moléculas orgânicas, correlacionando-os com a

teoria eletrostática de DEBYE e HUCKEL (78). A partir do trabalho de COHN (77) aumentou o interesse em pesquisas relativas ao esclarecimento de estrutura de aminoácidos, peptídeos e proteínas.

A importância das interações hidrofóbicas para a manutenção da estrutura nativa das proteínas foi muito bem elucidada por TANFORD (79).

ANFENSEN (80) demonstrou, em um importante trabalho realizado com a ribonuclease bovina, que esta proteína era capaz de desnaturar e se renaturar espontaneamente. Este experimento confirmou que, mesmo em proteínas relativamente pequenas, há forças intrínsecas originadas das propriedades físico-químicas dos aminoácidos. Isto é, se a seqüência de aminoácidos está ordenada, tudo o que tem que ser considerado são as propriedades individuais de cada aminoácido, e o comportamento desses em soluções aquosas.

As regiões estruturais da proteína são divididas em quatro níveis: a estrutura primária, que é a seqüência de aminoácidos e a localização das pontes dissulfetos, se houver; a estrutura secundária, que se refere ao arranjo espacial de aminoácidos que estão próximos uns dos outros na seqüência linear, sendo que algumas dessas relações estéricas são de um tipo regular, dando origem a uma estrutura periódica, como a α -hélice, a folha pregueada β e a α -hélice do colágeno; a estrutura terciária, que se refere ao arranjo espacial de aminoácidos e a estrutura quaternária, que se refere ao arranjo espacial das subunidades das cadeias de proteínas.

Estudos recentes de conformação, função e evolução de proteínas revelam a existência das estruturas supersecundárias (81), que se referem ao aglomerado da estrutura secundária, e dos domínios, que são os enovelamentos compactos de unidades globulares separadas, por um segmento flexível da cadeia, como pérolas em um cordão.

A elucidação da estrutura tridimensional da mioglobina por KENDREW (82), e da hemoglobina por PERUTZ et alii (83), são um marco importante para demonstrar que a cristalografia de raios X pode revelar a estrutura de moléculas tão grande quanto a das proteínas. Mais recentemente a ressonância magnética nuclear (RMN) tem sido utilizada por diversos autores, para a determinação da estrutura tridimensional das proteínas (84 e 85).

Em contraste com os sofisticados métodos para a compreensão da arquitetura das proteínas, os parâmetros termodinâmicos de desnaturação são determinados por métodos indiretos: agentes químicos (substâncias químicas desnaturantes como a úreia, cloridrato de guanidina) ou físicas (desnaturação pela

temperatura). A desnaturação, por agentes químicos, apresenta-se como um processo complicado, não bem esclarecido até agora, mas que atua sobre a estabilização da estrutura nativa. A desnaturação por temperatura tem considerável vantagem, neste aspecto, desde que o fator usado para a desnaturação tem apenas um significado físico (86). A determinação dos parâmetros termodinâmicos de desnaturação ganhou impulso devido ao excelente trabalho de PRIVALOV (87) utilizando micro DSC.

Com o propósito de elucidar o mecanismo de desnaturação das proteínas globulares, PRIVALOV (88) propôs um modelo de desnaturação para estas proteínas. Estas seriam formadas de blocos cooperativos ou sub-domínios moleculares, e à medida que vai ocorrendo o desenrolamento de um bloco cooperativo, isto acelera o desenrolamento de outro, tornando a desnaturação um processo rápido.

O mecanismo de desnaturação e renaturação é ainda um tópico controverso (89). Opiniões variam dependendo do enfoque dado a resultados termodinâmicos obtidos por desnaturação térmica ou de recentes evidências cinéticas, obtidos por desnaturação química. Os primeiros consideram que a desnaturação é um processo cooperativo, enquanto os segundos não ressaltam a cooperatividade. Os dois tipos de informações tendem a realçar diferentes aspectos do processo de desnaturação e renaturação das proteínas.

Dados termodinâmicos são quantitativamente consistentes com a idéia que o desenrolamento de proteínas globulares pequenas corresponde aproximadamente a um modelo em dois estados (LUMRY et alii (90), BRANDTS (91), TANFORD (92)).

PRIVALOV e KHECHINASHVILI (93) realizaram estudos calorimétricos de desnaturação térmica de cinco proteínas pequenas (ribonuclease, quimotripsinogênio, citocromo-c, lisozima e metamioglobina), mostrando que a relação da variação de entalpia de van't Hoff e da variação de entalpia medida calorimetricamente ($\Delta H_{\text{van't Hoff}} / \Delta H_{\text{DESN}}$) se aproximam da unidade, para cada uma das proteínas, isto é, obedecem a uma cinética de primeira ordem em dois estados.

Ainda não estão elucidados os caminhos que levam uma proteína a ter sua forma nativa ou desnaturada, mas como afirma ANFINSEN (80) em seu trabalho com a ribonuclease: "Deve-se considerar a seqüência de uma molécula proteica, a ponto de se enovelar numa forma geométrica precisa, como uma linha melódica escrita em forma canônica e projetada pela natureza para dobrar-se, criando acordes harmônicos de interação compatíveis com sua função biológica."

III.3. A IMPORTÂNCIA DA ÁGUA NA MANUTENÇÃO DA CONFORMAÇÃO NATIVA DAS PROTEÍNAS

A importância da água na manutenção nativa das proteínas, se deve além de suas propriedades físicas, à sua capacidade de solvatar regiões carregadas da proteína, sendo de igual importância a insolubilidade de regiões apolares da proteína neste solvente.

Os aspectos mais notáveis da estabilidade conformacional estão provavelmente associados com a alta organização das moléculas de água ao redor dos sítios hidrofóbicos no estado desnaturado. Esta ordenação é uma situação termodinamicamente instável desde que ela representa uma grande diminuição em entropia comparada com a proteína não solvatada (enovelada) mais moléculas de água livre. O modelo desta organização das moléculas de água ao redor dos sítios hidrofóbicos está esquematizado na Figura 3.

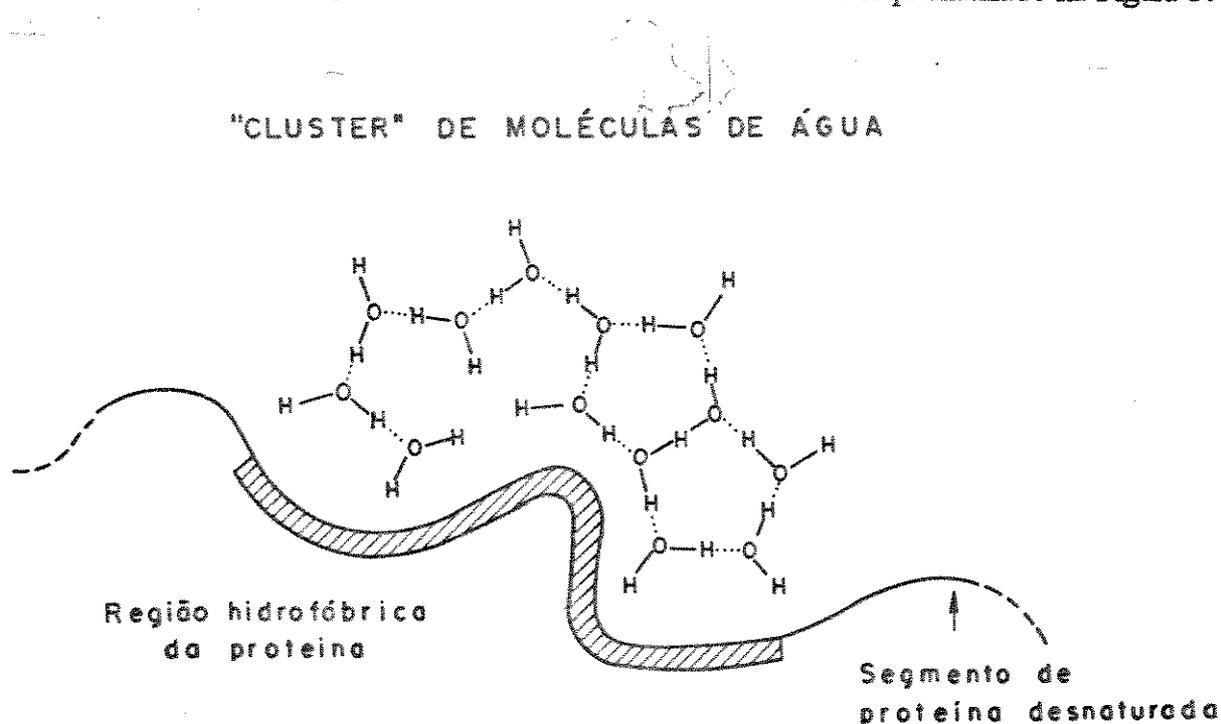


FIGURA 3. "Cluster" de Moléculas de Água.

III.4. FORÇAS ENVOLVIDAS NA CONFORMAÇÃO NATIVA DAS PROTEÍNAS

As forças envolvidas no enovelamento das proteínas e na manutenção desta complexa estrutura tridimensional podem ser classificadas em quatro categorias principais: forças eletrostáticas, forças de van der Waals, interações por pontes de hidrogênio, interações hidrofóbicas, além de ligações dissulfeto conforme mostrado no esquema da Figura 4.

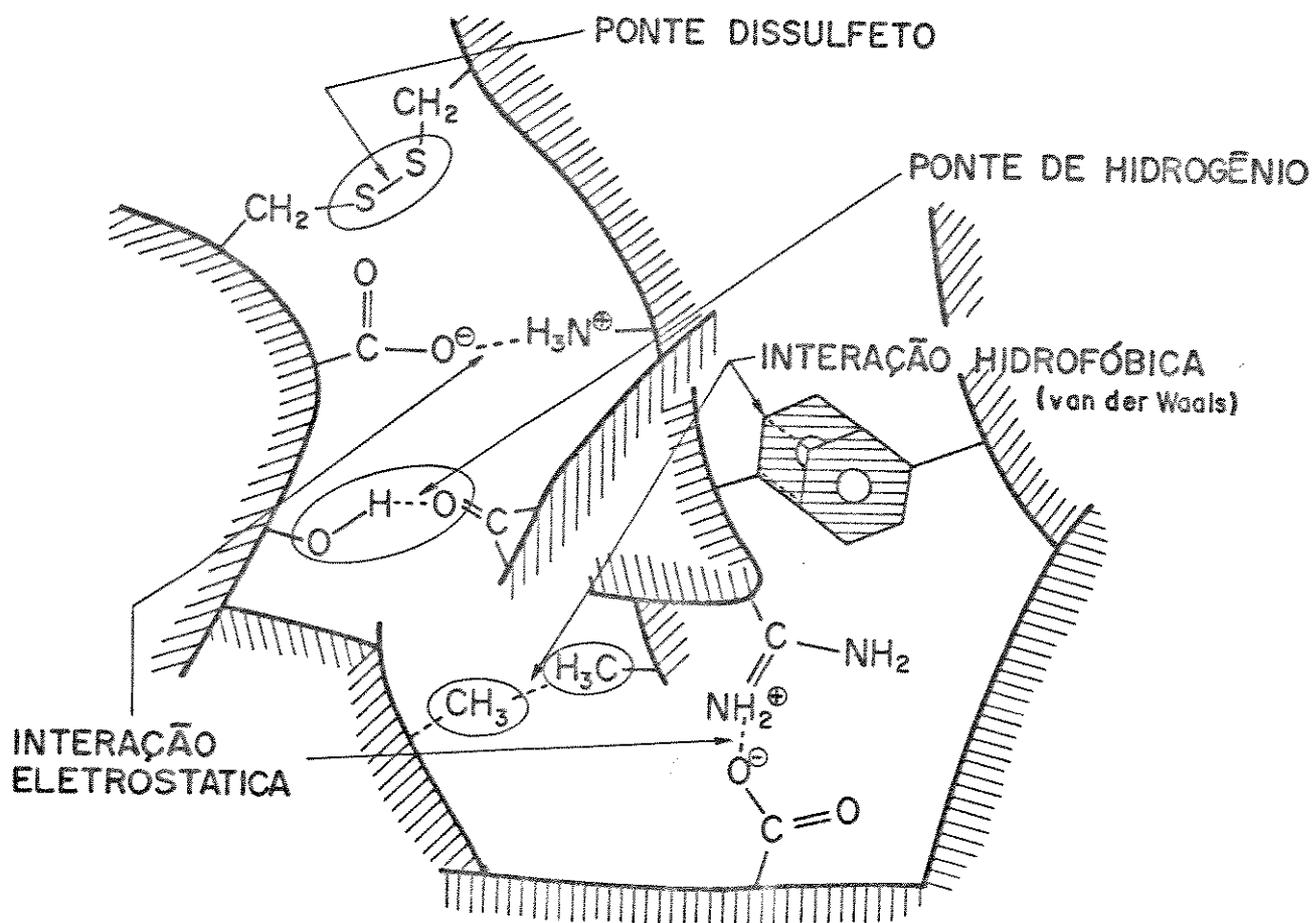


FIGURA 4. As forças envolvidas no enovelamento das proteínas (79).

III.4.1. Forças Eletrostáticas

Estas forças envolvem as seguintes interações entre os aminoácidos: interações carga-carga; interações carga-dipolo e interações dipolo-dipolo. Cada uma destas três interações tem uma função que depende da distância, mas são diferentes entre si, e dependem dos grupos que interagem.

No pH fisiológico alguns aminoácidos estão carregados (lisina, arginina, aspartato, glutamato, e algumas histidinas), portanto, favorecem as interações carga-carga entre aminoácidos de carga oposta, significantes no processo de enrolamento das proteínas sendo também significativas as interações íon-dipolo, dos grupos carregados com a água.

III.4.2. Forças de van der Waals

O termo forças de van der Waals refere-se as forças atrativas ou repulsivas devido a interações favoráveis entre os momentos dipolos induzidos instantâneos que resultam de flutuações da densidade de carga dos elétrons de átomos vizinhos. Tais forças tendem a ser pequenas, envolvendo energia da ordem de 0,4 até 0,8 kJ/mol¹. Este tipo de interação ocorre entre todos os tipos de moléculas polares e apolares na temperatura fisiológica (94). Dependendo da distância entre os grupos que estão interagindo, desde que a energia da ligação é inversamente proporcional à distância, essas serão mais ou menos intensas.

III.4.3. Ligações por Pontes de Hidrogênio

A conformação final de uma proteína depende de um grande número de pontes de hidrogênio. As pontes de hidrogênio podem se formar entre o esqueleto peptídico e a água ou entre os peptídios da estrutura e resíduos de aminoácidos polares. Aminoácidos com capacidade de formar ligações por pontes de hidrogênio tais como serina, tirosina e triptofano, os quais possuem grupo OH, podem formar pontes de hidrogênio com a água, com outro aminoácido ou com esqueleto peptídico. Alguns dos muitos tipos de pontes de hidrogênio que podem ser formados pelos resíduos de aminoácidos polares nas proteínas são mostrados na Tabela I.

TABELA I. EXEMPLOS DE PONTES DE HIDROGÊNIO QUE PODEM SER FORMADOS POR RESÍDUOS DE AMINOÁCIDOS POLARES (95).

Tipo de ponte de Hidrogênio		Distância entre átomo doador e receptor (nm).
Hidroxila - Hidroxila	$\begin{array}{c} \text{---O-H} \text{-----} \text{O---} \\ \qquad \qquad \qquad \text{H} \end{array}$	0,28
Hidroxila - Carbonila	$\text{---O-H} \text{-----} \text{O=C} \begin{array}{l} \diagup \\ \diagdown \end{array}$	0,28
Amida - Carbonila	$\begin{array}{c} \diagup \\ \diagdown \end{array} \text{N-H} \text{-----} \text{O=C} \begin{array}{l} \diagup \\ \diagdown \end{array}$	0,29
Amida - Hidroxila	$\begin{array}{c} \diagup \\ \diagdown \end{array} \text{N-H} \text{-----} \text{O---} \\ \qquad \qquad \qquad \text{H} \end{array}$	0,30
Amida - N do Imidazol	$\begin{array}{c} \diagup \\ \diagdown \end{array} \text{N-H} \text{-----} \text{N} \begin{array}{c} \diagup \\ \diagdown \end{array} \text{N-H} \end{array}$	0,31
Amida - Enxofre	$\begin{array}{c} \diagup \\ \diagdown \end{array} \text{N-H} \text{-----} \text{S} \begin{array}{l} \diagup \\ \diagdown \end{array}$	0,37

A variação de energia livre de formação de ponte de hidrogênio é da ordem de -13 kJmol^{-1} a -30 kJmol^{-1} . Podemos questionar se a formação de estruturas secundárias envolvendo pontes de hidrogênio colabora significativamente para o processo de enovelamento da proteína. Podemos examinar esta questão considerando a formação de pontes de hidrogênio num composto modelo N-dimetilacetamida em água e em solvente não polar (CCl_4) conforme esquematizado na Figura 5.

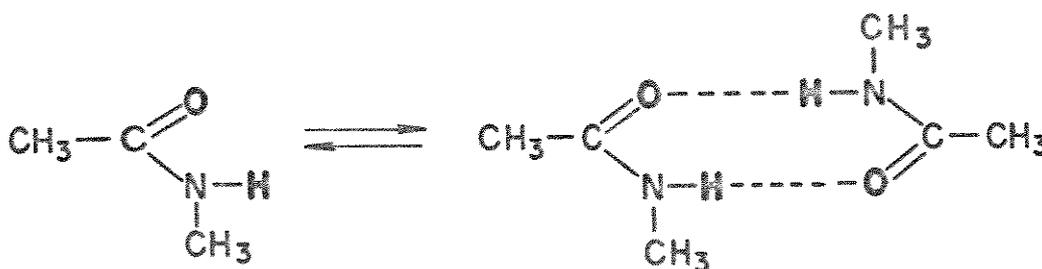


FIGURA 5. Equilíbrio entre N-dimetilacetamida e seu dímero por ponte de hidrogênio (95).

A constante de equilíbrio para a dimerização da N-dimetilacetamida em água é $5 \cdot 10^{-3} \text{ M}$ e a variação de energia livre é $+28,4 \text{ kJ/mol}^{-1}$ (95). Em solventes não polares (CCl_4) a constante para dimerização é $57,2 \text{ M}$ e a variação de energia livre é $-10,1 \text{ kJ/mol}^{-1}$. A variação de energia livre positiva para formação da ponte de hidrogênio em água indica um processo desfavorável, enquanto a variação de energia livre negativa para a formação da ponte de hidrogênio no solvente não polar indica um processo espontâneo. Estes resultados sugerem que pontes de hidrogênio entre resíduos de aminoácidos tendem a se formar no interior hidrofóbico da proteína.

Portanto, durante o enovelamento da proteína, quando pontes de hidrogênio se formam entre os resíduos de aminoácidos no interior da proteína, um número igual de pontes de hidrogênio entre a proteína e a água devem ser rompidas de maneira que não há um aumento no número total de pontes de hidrogênio.

A interação por ponte de hidrogênio é responsável pela estabilização da conformação enovelada da proteína, mas não é a interação que contribui significativamente para o processo que impulsiona o enovelamento.

III.4.4. Interações Hidrofóbicas

A interação hidrofóbica é a força responsável pelo enovelamento. Imaginando uma cadeia polipeptídica desenrolada em solução, os peptídios polares da cadeia são estabilizados por solvatação. As moléculas de água interagem de maneira muito diferente com aminoácidos não polares sendo as interações água-água muito mais fortes que as interações entre moléculas de água e grupos não polares. Em consequência disso, a água ao redor das regiões não polares se arranja por pontes de hidrogênio numa estrutura altamente organizada formando uma espécie de gaiola ao redor do grupo não polar (96).

Com o enovelamento da cadeia polipeptídica, ocorre a remoção das regiões hidrofóbicas em contato com as gaiolas de água altamente organizadas, fazendo com que as regiões hidrofóbicas fiquem em contato umas com as outras no centro da proteína. O arranjo das moléculas de água é rompido e as moléculas de água são libertadas na solução. Embora o rompimento das gaiolas represente uma perda na variação da entalpia de formação das pontes de hidrogênio favorável ($\Delta H < 0$), o processo de rompimento é endotérmico ($\Delta H > 0$), portanto desfavorável, mas o aumento de entropia ($\Delta S > 0$) contrabalança o termo entálpico e a interação entre as regiões hidrofóbicas da cadeia peptídica é espontânea, fenômeno este conhecido como efeito hidrofóbico (79).

Deve-se ressaltar que a proteína, em sua forma nativa, reflete um delicado balanço entre os vários tipos de interação que estabilizam a sua estrutura enovelada. Este importante balanço energético é essencial para manifestação das propriedades funcionais e estabilidade das proteínas em seu estado nativo.

III.5. ASPECTOS CINÉTICOS DO ENOVELAMENTO DAS PROTEÍNAS

Um aspecto intrigante do enrolamento de polipeptídicos em sua conformação nativa é a velocidade extremamente rápida na qual ele ocorre (97).

Uma avaliação estritamente matemáticas, que seria incompatível com a idade dos seres vivos se uma proteína tentasse todas as possíveis formas até chegar a sua conformação nativa. Ainda que a resposta completa a esta dedução não seja conhecida, parece razoável que esse processo seja auxiliado pelo princípio da cooperatividade (88). Isto é, somente algumas ligações (pontes de hidrogênio ou interações hidrofóbicas) que já estejam corretamente formadas, numa parte da cadeia polipeptídica irão aumentar muito a probabilidade de formação de outras ligações corretas sem necessidade da cadeia tentar todas as conformações possíveis (93).

Em outras palavras, é como se o polipeptídeo enovelado ao acaso sofresse um processo de nucleação, semelhante ao que observamos em uma solução supersaturada de um sal, que se cristaliza imediatamente quando ele é nucleado. O que não conhecemos ainda é, em que parte da proteína tem início o enrolamento.

O desenrolamento térmico das proteínas estudado espectrofotometricamente mostra curvas muito inclinadas de desnaturação, o que sugere que uma proteína existe apenas em dois estados, o nativo e o desnaturado. Com o desenvolvimento de aparelhos mais sofisticados como o DSC e micro DSC tornou-se possível visualizar os estados intermediários de desnaturação de algumas proteínas, bem como calcular os valores de variação de entalpia de desnaturação por DSC e de variação de entalpia de desnaturação utilizando a equação de van'T Hoff.

IV. A APLICAÇÃO DA CALORIMETRIA NO ESTUDO DE SISTEMAS DE NATUREZA BIOLÓGICA

IV.1. INTRODUÇÃO

Praticamente, todos os processos de natureza química, física e biológica são acompanhados por efeitos térmicos. Métodos de medidas da variação da entalpia, métodos calorimétricos, são portanto de um interesse potencial para todas as espécies de análises químicas e biológicas. No entanto, a grande quantidade de substâncias necessárias para a calorimetria convencional e sua baixa sensibilidade foram sempre fatores limitantes (98).

Avanços na tecnologia dos sensores Peltier ou termopilhas (99) têm permitido a aplicação de técnicas calorimétricas no estudo de sistemas biológicos complexos devido à sensível detecção de pequenas quantidades de calor, utilizando amostras reduzidas. Esta técnica recebeu a denominação de microcalorimetria biológica (100).

Microcalorimetria biológica é uma técnica valiosa para monitorar em tempo real uma grande variedade de processos biológicos e sendo uma técnica não específica, não destrutiva e , não exige a priori que a amostra ou o sistema a ser analisado tenha algum tipo de tratamento podendo-se usar soluções de compostos bioquímicos, suspensões grosseiras, células, microorganismos, etc.

Pelo fato de não requerer objetos opticamente transparentes, a microcalorimetria biológica tem uma vantagem sobre os métodos espectrofotométricos (101).

O efeito térmico que acompanha por exemplo uma reação pode ser registrado em tempo real por meio desta técnica. O registro do efeito térmico durante um processo biológico é chamado termograma. O termograma ou curva dq/dt (J/s) x tempo (horas) (IUPAC, IUPAB, IUB, Interunion Commission on Thermodynamics 1982) (102) determina em tempo real o calor desenvolvido no processo.

A grande contribuição da microcalorimetria no estudo de sistemas bioquímicos é na possibilidade de propor modelos para os processos investigados através da análise dos termogramas (103).

IV.2. HISTÓRICO

O estudo calorimétrico de reações enzimáticas foi iniciado na década de cinquenta por STURTEVANT (104). Este autor estudou enzimas capazes de clivar substratos de pequeno peso molecular.

RAWITSCHER et alii (105) estudaram a variação de entalpia de reação para as enzimas carboxilpeptidase e leucinoamino peptidase, usando o substrato sintético L-tirosilgliciminada.

Com os aprimoramentos introduzidos aos calorímetros na década de setenta houve um impulso no estudo dos parâmetros cinéticos por calorimetria. Entre eles podem ser citados os trabalhos realizados por FLOGEN e BILTONEN (106) utilizando a ribonuclease; SHIÃO e STURTEVANT (107), com tripsinogênio A, lisozima e citocromo c; BOLEN et alii (108) com a quimotripsina e quimotripsinogênio.

Na década de oitenta o grupo de FERSHT (109) propôs um modelo para o mecanismo de ação da quimotripsina constituído de duas etapas: uma acilação e uma desacilação, envolvendo uma protonação, sendo que a serina-195 seria o aminoácido essencial para a catálise enzimática. Estes autores concluíram que as trocas de ligações de prótons ocorrem quando se varia o pH das soluções tampões.

A partir destes dados BOLEN et alii (108) estudaram sistematicamente a hidrólise do 3-(2-furil) acrililimidazol pela alfa quimotripsina, através da técnica de microcalorimetria de fluxo, variando o pH. Com os dados obtidos por esta técnica foi possível diferenciar a etapa de acilação, da desacilação, podendo elucidar o mecanismo de ação desta enzima.

A partir de 1985 houve um crescente interesse no estudo de enzimas imobilizadas, utilizando-se microcalorimetria de fluxo. OWUSU e FINCH (110) determinaram os parâmetros cinéticos e termodinâmicos da glicose-oxidase imobilizada em vidro.

BATISTELA et alii (111) determinaram através de técnicas microcalorimétricas os parâmetros físico-químicos e cinéticos da ribonuclease, demonstrando que o processo de imobilização modifica a temperatura de transição da enzima, protegendo-a contra a desnaturação térmica.

Devido aos avanços na tecnologia de construção dos microcalorímetros existe uma tendência cada vez maior de se determinar os parâmetros físico-químicos e cinéticos, utilizando-se técnicas microcalorimétricas. Entretanto, as enzimas do látex do mamoeiro apesar de terem um mecanismo de ação muito semelhante ao da quimotripsina ainda não foram estudados através dessas técnicas.

V. OBJETIVOS

Nesse trabalho de tese tivemos como objetivos: a extração, purificação, o estudo cinético, a estabilidade térmica e a variação da entalpia de proteólise das enzimas livres e imobilizadas presentes no látex de *Carica papaya*.

Este trabalho de tese foi dividido em seis partes: purificação das enzimas papaína, quimopapaína B e papaya proteinase; caracterização cinética das enzimas; estudo da atividade em função do tempo; imobilização destas proteases; estudo da variação da entalpia de desnaturação e calorimetria da reação proteolítica.

VI. PARTE EXPERIMENTAL

VI.1. EXTRAÇÃO DAS ENZIMAS DO LÁTEX SECO

Trinta gramas do látex de procedência da Wallarstein do Brasil foi macerado em almofariz de porcelana até a obtenção de um pó fino. Esse foi diluído em 90ml de solução aquosa de EDTA 1 mM, com agitação suave durante 12 horas a 4°C. A suspensão obtida foi centrifugada (12.100-g) em uma centrífuga modelo Beckman J2-21 durante 20 minutos, a 4°C. O sobrenadante foi coletado e dialisado contra dois litros de água destilada, a 4°C, durante um período de seis horas para eliminar pequenos peptídeos que inibem as proteases do látex.

Cada enzima foi purificada segundo metodologia desenvolvida em nosso laboratório, e descrita a seguir, permitindo obter as proteínas em sua forma pura.

VI.2. PREPARAÇÃO DA RESINA CM-CELULOSE

A resina de CM-Celulose (Sigma) foi colocada para hidratar em água destilada, sendo as partículas finas removidas por decantação.

Em seguida foi reciclada por tratamento com ácido clorídrico 0,5 M por trinta minutos com agitação suave, lavada com água destilada até pH neutro, o mesmo tratamento foi realizado com hidróxido de sódio 0,5 M e água destilada até pH neutro (17). Posteriormente, a resina foi equilibrada com tampão acetato de sódio 0,4 M pH 5,0 até o eluente atingir o mesmo pH e deaerada em temperatura ambiente por trinta minutos. Para certificar-se que a resina estava equilibrada mediu-se a condutividade e o pH do eluente.

VI.3. ISOLAMENTO CROMATOGRÁFICO DOS COMPONENTES PROTEÍCOS DO LÁTEX DO MAMOEIRO

Uma amostra de 30 ml, contendo 3200 mg de proteínas, foi aplicada em coluna de CM-Celulose de 30x1,5 cm, equilibrada à temperatura de 25°C, com um fluxo de 60 ml por hora.

A eluição foi realizada com um gradiente descontínuo de tampão acetato de sódio pH 5,0 com as seguintes concentrações: 0,4 M; 0,5 M; 0,6 M; 0,8 M e 1,0 M. Foram coletados 5ml de eluente por tubo, utilizando-se coletor de frações Incibrás, modelo Fracil 100.

Os picos obtidos foram reunidos conforme mostra a Figura 11 e em seguida dialisados contra dois litros de EDTA 1 mM, com trocas sucessivas a cada seis horas (a ausência de sais acetato foi avaliada em testes com sulfato de bário), à temperatura de 4°C. Após a diálise, as amostras foram liofilizadas e a pureza dessas foram avaliadas por eletroforese em gel de poliacrilamida.

VI.4. PURIFICAÇÃO DA PAPAÍNA

A papaína foi isolada por modificações do método de BROCKHEURST e BAINES (17). O látex do mamoeiro após ser submetido ao tratamento descrito no item VI.1 teve seu pH ajustado para 9,0 com a adição de hidróxido de sódio 0,1 M e a suspensão obtida foi centrifugada a 12.100-g a 4°C por vinte minutos.

VI.4.1. Fracionamento com Sulfato de Amônio 45%

O sobrenadante foi colocado em banho de gelo, e sob agitação suave, acrescentou-se sulfato de amônio, até uma saturação de 45% (277g/l). Em seguida foi deixado por 20 minutos, a 0°C. A suspensão formada foi centrifugada a 12.100-g por 10 minutos, à temperatura de 0°C. O precipitado (fração I) foi dissolvido em tampão fosfato de sódio 0,1M pH 7,0.

VI.4.2. Fracionamento com sulfato de Amônio 40%

A fração I foi colocada em banho de gelo, sob agitação suave e saturada com sulfato de amônio (250g/l). A suspensão foi deixada por 20 minutos, a temperatura de 0°C, e centrifugada a 12.100-g por 10 minutos, na mesma temperatura de 0°C. O precipitado (fração II) foi suspenso em tampão fosfato de sódio 0,1M pH 7,0.

VI.4.3. Fracionamento com Cloreto de Sódio

A fração II foi colocada em banho de gelo, e a papaína foi precipitada pela adição lenta de cloreto de sódio (1g de NaCl por 10ml de solução). Depois de 20 minutos o precipitado foi coletado por centrifugação (fração III) a 12.100-g por 20 minutos a 0°C.

VI.4.4. Cristalização

A fração III foi suspensa em tampão fosfato de sódio 0,1 M pH 7,0, à temperatura ambiente. A suspensão foi deixada em repouso durante 30 minutos, a temperatura ambiente, sendo a seguir, mantida a 4°C por 18 horas. Os cristais formados foram coletados por centrifugação a 12.100·g por 10 minutos, a 4°C e armazenados em tampão fosfato de sódio 0,1 M pH 7,0 a 4°C durante o período máximo de 30 dias.

VI.5. ELETROFORESE EM GEL DE POLIACRILAMIDA

Para verificar a pureza das enzimas obtidas do látex, foram realizadas eletroforeses em gel de poliacrilamida, em placas acopladas em cubas de acrílico (18,00 cm x 16,8 cm x 3,0 cm) confeccionadas em nosso laboratório. A fonte de eletroforese teve também o esquema do circuito desenvolvido em nosso laboratório e foi confeccionada na Oficina Eletrônica do Instituto de Química. As placas de gel mediam 15,5 cm de largura, por 15,0 cm de altura, por 1mm de espessura.

As eletroforeses em gel de poliacrilamida foram realizadas pelo procedimento de REISFELD (112) para proteínas básicas. O gel de separação foi preparado a uma concentração de 15% de acrilamida, o qual foi introduzido na placa até a altura de 12 cm. Após a polimerização, introduziu-se o gel de empilhamento (3%) até atingir o limite superior da placa, colocando-se, então, o pente para formação dos poços. Depois da polimerização, o pente foi retirado para colocação das amostras.

VI.5.1. Preparação das Amostras

As amostras foram preparadas da seguinte maneira: em um pequeno tubo de ensaio, foram misturados volumes iguais de uma solução de proteína em concentração adequada e o diluente, sendo que este último era constituído de: 0,5ml de fucsina 0,01% (indicador); 1,0ml de glicerol; 0,5ml de tampão β -alanina 0,34M pH 4,5. Em seguida, alíquotas de 50 a 80 μ l de cada amostra foram aplicadas no gel com o auxílio de uma microseringa. As eletroforeses foram realizadas, à temperatura ambiente durante 8 horas, com uma corrente de 50mA. Encerrou-se a corrida quando a faixa vermelha do corante (fucsina) se aproximou do limite inferior do gel.

VI.5.2. Fixação, Coloração e Descoloração dos Géis

A fixação e coloração dos géis foram realizadas com uma solução contendo 3g de ácido tricloroacético, 9g de ácido sulfossalicílico e 300mg de Coomassie Brilliant Blue R-250, em 200 ml de água destilada.

Os géis foram retirados das placas e imersos nesta solução por uma noite, à temperatura ambiente. A remoção do excesso de corante foi feita com banhos repetidos de uma solução contendo: 250ml de etanol, 650ml de água destilada e 80 ml de ácido acético glacial.

VI.6. ELETROFORESE EM GEL DE POLIACRILAMIDA NA PRESENÇA DE SDS

Os géis para eletroforeses foram preparadas segundo o método de LAEMMLI e FARVE (113).

VI.6.1. Preparação da Amostra

Uma alíquota, com concentração adequada de proteína foi dissolvida no mesmo volume de uma solução desnaturante, constituída de: SDS 10%; Sacarose 40%; β -mercaptoetanol 20 ml e tampão tris-HCl pH 8,8 1,0 M e 1 μ l de uma solução do indicador azul de bromofenol 0,01%. As amostras foram aquecidas em banho de água fervente por 5 minutos, esfriadas e alíquotas de 100 μ l foram aplicadas no gel.

VI.6.2. Coloração com Prata

O gel foi tratado três vezes com 100 ml de uma solução de 50% de etanol, durante vinte minutos. Em seguida o gel foi colocado em contato com uma solução 100 mM de tiosulfato de sódio durante 1 minuto. A seguir lavado duas vezes com água destilada, sendo que cada troca era realizada a cada vinte segundos e subsequente com uma solução de nitrato de prata 0,1% contendo 5 μ l de formaldeído durante vinte minutos (etapa de impregnação da prata com a proteína). A solução de prata foi retirada, e o gel lavado rapidamente com água destilada. O gel foi colocado em contato com 100 ml de uma solução de carbonato de sódio 3%, tiosulfato de sódio 0,01% e formaldeído 0,5%, até o aparecimento das bandas proteicas. Para interromper a coloração, foi utilizada uma solução de 50% de metanol, 12% de ácido acético. Após dez minutos, lavou-se várias vezes com água destilada por trinta minutos e conservou-se o gel em uma solução de 0,03% de carbonato de sódio para prevenir o clareamento das bandas.

VI.7. DOSAGEM DE PROTEÍNAS

VI.7.1. Preparação do Reagente de Fenol

O reagente de fenol foi preparado de acordo com o método proposto por ASSUMPÇÃO e MORITA (114).

VI.7.2. Método de Lowry

A curva padrão de dosagem de proteína foi realizada com soro albumina bovina pelo método de LOWRY (115). 2 ml de solução de proteínas reagiu com uma solução de tartarato de sódio em meio alcalino. Após 15 minutos adicionou-se 0,5 ml do Reagente de Fenol, sendo a leitura de absorbância realizada a 660 nm num espectrofotômetro UV modelo Beckman DB-G.

VI.7.3. Medidas da Absorbância em 280nm

Devido à presença de tirosina, triptofano e fenilalanina, as proteínas exibem absorção no comprimento de 280 nm. Isto possibilita uma medida sensível e rápida da concentração de proteínas.

No presente trabalho, determinamos espectrofotometricamente a concentração da papaína, quimopapaína B e papaya proteinase, utilizando o valor do coeficiente de extinção molar de cada uma das proteases (para papaína 25; quimopapaína A 18,7; quimopapaína B 18,3; papaya proteinase 17,9 a 280 nm) (17). Quando as soluções de proteínas apresentavam uma absorbância com valores superiores a 1,0 foram diluídas convenientemente.

VI.8. CINÉTICA ENZIMÁTICA

Neste trabalho o estudo cinético das enzimas proteolíticas foi realizado utilizando-se quatro substratos diferentes: 1) Caseína tipo Hammrsten (Merck); 2) Caseína N, N'-dimetilada; 3) BAEE (Sigma); 4) Z-ala-pNP (Sigma) Os substratos, 1 e 2 são protéicos e 3 e 4 são sintéticos. Nos substratos protéicos observamos a atividade proteolítica (quebra de ligação peptídica) e nos substratos sintéticos observamos a atividade esterásica (quebra da ligação éster). Na realização dos estudos cinéticos, para as enzimas quimopapaína B e papaya proteinase foi efetuado um "pool" de cinco cromatografias em coluna e para papaína um "pool" de duas preparações como descrita no item VI.4.

Como dispunhamos de pouca caseína N, N' dimetilada da Sigma para todo o trabalho, dimetilamos a caseína de Hammrsten de acordo com o procedimento proposto por CABACUNGAN et alii (116). A comparação da caseína dimetilada com a da Sigma foi feita através da determinação de aminoácidos por hidrólise em meio ácido de acordo com o método de SANGER (117), utilizando o analisador de aminoácidos modelo Aminochrom II. As duas caseínas foram também comparadas utilizando a eletroforese em infravermelho e RMN (Ver Apêndice).

VI.8.1. Substratos: Caseína tipo Hammrsten, Caseína N, N'-Dimetilada

O método cinético é baseado na medida da quantidade de substâncias com baixo peso molecular não precipitável por TCA a 5%, produzida pela ação da enzima sobre uma dada proteína (ARNON (118)).

A mistura de reação contida num volume de 3 ml foi: tampão fosfato de sódio 0,1 M pH 7,0; solução de cisteína 5 mM e EDTA 1 mM; solução de enzima com a concentração variando na faixa de $2 \cdot 10^{-6}$ a $5 \cdot 10^{-6}$ M. Para todos os substratos estudados a mistura de reação foi sempre a mesma, entretanto, ressaltamos que, para o estudo do substrato sintético Z-ala-pNP a força iônica do tampão foi ajustada para 0,8 M com KCl, e adicionamos acetonitrila 6,7%. Os experimentos foram sempre realizados em triplicata.

A mistura foi termostalizada a 37°C, em seguida, adicionou-se 1 ml do substrato a 1% (caseína tipo Hammrsten ou caseína N, N'-dimetilada), e deixou-se reagir por trinta minutos. Interrompeu-se a reação pela adição de 3ml de TCA 5%, esperou-se dez minutos a temperatura ambiente, após o qual, a mistura foi filtrada. A solução obtida desta precipitação continha peptídeos, cuja concentração foi acompanhada pela medida da absorbância a 280 nm, de acordo com o método descrito por ARNON (118). A conversão de unidade de absorbância em concentração de peptídeos, foi efetuada através da obtenção de uma curva padrão utilizando tirosina. Foi definido como unidade de atividade enzimática a quantidade de enzima necessária para produzir 1 μ mol de tirosina por minuto, nas condições experimentais utilizadas.

VI.8.2. Substrato BAEE

O método baseia-se na quebra da ligação éster para o substrato de pequeno peso molecular BAEE e Z-ala-pNP.

A mistura de reação anteriormente citada foi colocada no espectrofotômetro por vinte minutos à 25°C. Após estabilização térmica, adicionou-se 25 μ l do substrato BAEE com uma concentração final de 14,5 mM,

sendo o produto formado, a benzoil arginina, seguida pela leitura de absorbância a 325 nm, de trinta em trinta segundos de acordo com o método descrito por SCHWERT e TAKENAKA (119). A conversão de unidade de absorbância em concentração foi efetuada através de uma curva padrão, utilizando a benzoil arginina. A benzoil arginina utilizada para a obtenção da curva padrão foi sintetizada de acordo com o procedimento descrito por BERGMANN et alii (120). Uma unidade de atividade enzimática foi definida como a quantidade de enzima necessária para produzir 1 μmol de benzoil arginina por minuto, nas condições do experimento.

VI.12.3. Substrato Z-ala-pNP

A mistura de reação foi colocada no espectrofotômetro por vinte minutos à 25°C para termortatizar. Posteriormente, 25 μl do substrato Z-ala-pNP com uma concentração final de 14,5 mM foi adicionado a cubeta de reação e, em seguida, zerada contra o branco. Imediatamente iniciou-se a medida da absorbância em intervalos de trinta em trinta segundos. A reação foi seguida a 400 nm, por análise do produto formado (p-nitrofenol). A conversão de absorbância em concentração de produto e a definição da unidade de atividade enzimática foram realizadas como descrito anteriormente, levando-se em consideração o produto formado.

VI.9. TRATAMENTO DOS DADOS CINÉTICOS

Para os cálculos dos parâmetros Cinéticos tomou-se como modelo a equação clássica de Michaelis e Menten (121).



A velocidade da reação, baseada neste modelo será:

$$V = \frac{V_{\text{máx}}[S]}{K_M + [S]} \quad K_M = \frac{k_{-1} + k_{+2}}{k_{+1}} \quad (2)$$

onde K_M representa a constante de dissociação do complexo ES e $V_{\text{máx}}$, a velocidade máxima.

No método de LINEWEAVER e BURK (122) para a determinação do K_M , a equação 2 é empregada sob a forma de duplo recíproco:

$$\frac{1}{V} = \frac{1}{V_{m\acute{a}x}} + \frac{K_M}{V_{m\acute{a}x}} \frac{1}{[S]} \quad (3)$$

Apesar de ser muito utilizado, este método apresenta a seguinte desvantagem: a maioria dos pontos ficam todos muito próximos, devendo-se traçar a reta através destes pontos.

Optamos pela método de HANES (123) que distribui melhor os pontos ao longo da reta.

Por este método a equação 3 é multiplicada por [S] ficando:

$$\frac{[S]}{V} = \frac{[S]}{V_{m\acute{a}x}} + \frac{K_M}{V_{m\acute{a}x}} \quad (4)$$

VI.10. ATIVAÇÃO E FUNCIONALIZAÇÃO DE MICRO ESFERAS DE SÍLICA GEL PARA A IMOBILIZAÇÃO DAS ENZIMAS

Trinta grammas de sílica gel (Fluka 60) com diâmetro médio dos poros de 60Å, tamanho das partículas entre 0,2-0,5mm, foram inicialmente secas a vácuo, a uma temperatura de 150°C, durante quatro horas para retirar a água adsorvida na superfície. Em seguida, a sílica gel foi silanizada com 3-aminopropiltrietoxisilano.

A silanização foi feita adicionando: 200ml de tolueno previamente tratado, segundo o procedimento descrito em ASSUMPÇÃO e MORITA (114), trinta grammas de sílica ativada e 10 ml de 3-aminopropiltrietoxisilano. A mistura foi deixada sob atmosfera de nitrogênio na linha de vácuo e refluxada com agitação por 48 horas. A sílica foi então filtrada e lavada, várias vezes, com etanol seco, e depois deixada secar à vácuo a 80°C por quatro horas.

VI.11. IMOBILIZAÇÃO DAS ENZIMAS PROTEOLÍTICAS NA SÍLICA GEL

A sílica silanizada foi tratada com glutaraldeído (5% V/V) em tampão fosfato de sódio 0,1M, pH 7,0 e então colocada em contato com solução de enzima (14,12 mg/ml, dissolvida no mesmo tampão) por duas horas à temperatura ambiente. Imediatamente após adição da enzima, as esferas de sílica gel adquiriram coloração marrom avermelhada. As proteases imobilizadas foram armazenadas a 4°C, em tampão fosfato de sódio 0,1M pH 7,0 contendo 0,02% de ázida de sódio, para evitar a contaminação por microrganismos. O

mecanismo de funcionalização das microesferas de vidro e imobilização das proteases está esquematizado na Figura 6.

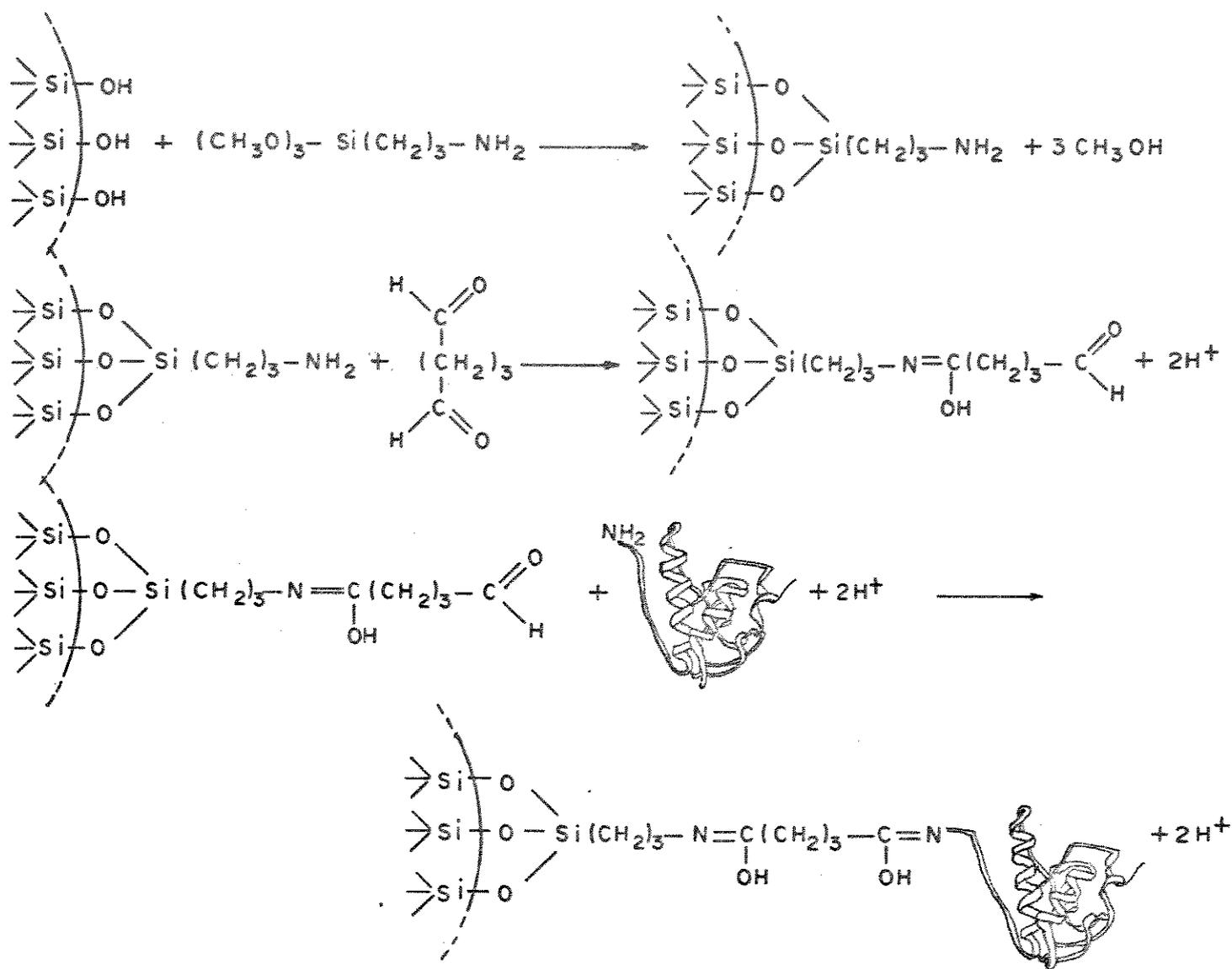


FIGURA 6. Mecanismo de funcionalização das microesferas de vidro e imobilização das proteases.

VI.12. CINÉTICA ENZIMÁTICA DAS ENZIMAS IMOBILIZADAS EM SÍLICA GEL

O estudo cinético das enzimas proteolíticas imobilizadas na superfície da sílica gel foi realizada como segue: colocou-se 0,22 g de sílica gel em erlemmeyer contendo 2,2 mg de proteína, 5 ml de tampão fosfato de sódio 0,1 M pH 7,0, 1 ml de uma solução 5 mM de cisteína e 1 mM de EDTA. O erlemmeyer foi

mantido num banho modelo Dubnoff SE 093 com agitação a 37°C. Adicionou-se o substrato caseína N,N'-dimetilada a 1%, deixando-se o sistema reagir por trinta minutos. Retirou-se então uma alíquota de 5 ml e adicionou-se 5 ml de TCA 5% para interromper a reação. Em seguida, filtrou-se e determinou-se a absorbância a 280 nm. A cinética enzimática das enzimas imobilizadas foi estudada numa faixa de pH de 4,0 até 8,0 para a determinação do pH ótimo. Cada experimento foi realizado em triplicata.

VI.13. ESTABILIDADE DA ATIVIDADE DAS ENZIMAS PROTEOLÍTICAS DO LÁTEX DE *Carica papaya* IMOBILIZADAS EM FUNÇÃO DO TEMPO

As determinações das atividades enzimáticas das proteases (conforme descrito no ítem VI.12), foram realizados uma vez por mes durante um período de oito meses. Estas enzimas foram armazenadas em tampão fosfato de sódio 0,1 M pH 7,0 a 4°C, contendo 0,02% de ázida de sódio para evitar sua contaminação por microrganismos.

VI.14. ESTABILIDADE DAS ENZIMAS PROTEOLÍTICAS

A estabilidade das proteases do látex do mamoeiro em solução e imobilizada foi examinada para comparação, diariamente, durante um período de trinta dias, através da determinação de suas atividades específicas.

VI.15. DETERMINAÇÃO DA VARIAÇÃO DA ENTALPIA DE DESNATURAÇÃO DAS ENZIMAS ΔH_{DESN}

A estabilidade térmica das enzimas foi estudada utilizando um calorímetro DSC convencional modelo Dupont 910.

Foram utilizadas amostras concentradas das enzimas em tampão fosfato 0,1M pH 7,0 e citrato 0,1M pH 3,0. As enzimas foram fechadas hermeticamente em micro-panels de alumínio. Na referência do DSC utilizou-se a panela com solução tampão.

Todos os termogramas foram obtidos na mesma velocidade de aquecimento 5°C min⁻¹, numa faixa de 50 até 110°C. O calor de desnaturação das enzimas (Joules·g⁻¹) obtido por medidas no DSC foi feito por comparação com a calibração com Índio metálico. Verificou-se que as enzimas estudadas apresentam reversibilidade.

VI.16. DETERMINAÇÃO DA VARIAÇÃO DA ENTALPIA DE DESNATURAÇÃO DAS ENZIMAS IMOBILIZADAS

Para se estudar a estabilidade térmica das enzimas imobilizadas, realizou-se antes o termograma do suporte sílica gel silanizada para certificar-se que o mesmo não apresentava transição significativa na faixa de temperatura de 50 até 110°C.

A estabilidade térmica das enzimas imobilizadas foram estudadas em pH 7,0, como descrito no item anterior.

VI.17. O MODELO DE DOIS ESTADOS PARA A DESNATURAÇÃO – ASPECTOS CINÉTICOS E TERMODINÂMICOS

Devido ao fato da desnaturação de uma enzima pelo calor ser um processo complexo, a Físico-Química tem na maioria das vezes assumido que o processo de desnaturação é um processo entre dois estados (nativo e desnaturado).



onde a constante de desnaturação de acordo com a equação (1) é $K_D = [D] / [N]$. Fazendo-se a consideração acima, os parâmetros ΔG° , ΔH° e ΔS° podem ser obtidos das relações termodinâmicas usuais.

PRIVALOV (124) através de medidas de estabilidade térmica de enzimas usando DSC confirma que, para a maioria das enzimas, a cinética de desnaturação ocorre entre os dois estados citados, entretanto, PRIVALOV (88) ressalta que, para algumas enzimas, os dados termodinâmicos e cinéticos obtidos por DSC considerando os modelos de dois estados não explica o processo de desnaturação. Obviamente, outros mecanismos em adição ao estado nativo e desnaturado devem ser considerados. Supondo que a reação (1) possa ser escrita considerando estágios intermediários de desnaturação temos:



onde X_i é um estágio intermediário. Se uma propriedade física Y (exemplo: fluxo de calor dq / dt medido no DSC) é medida como uma função da temperatura, ela terá vários valores que são médias das propriedades características das várias espécies X_1, X_2 , etc. ponderadas pela respectiva frequência de ocorrência de cada espécie. O valor observado para propriedade física Y será então:

$$Y = f_N Y_N + f_D Y_D + \sum_i f_i X_i \quad (3)$$

onde D, N e I se referem, respectivamente, à forma desnaturada, à forma nativa e ao iésimo intermediário, e o termo f é a frequência de cada espécie. Considerando no processo de desnaturação térmica, a relação de conservação, ou seja:

$$f_N + f_D + \sum_i f_i = 1 \quad (4)$$

e substituindo na equação (3) obtemos a fração de desnaturação aparente f_{ap} :

$$f_{ap} = \frac{(Y - Y_N)}{(Y_D - Y_N)} = f_D + \sum_i f_i d_i \quad (5)$$

onde

$$d_i = \frac{(Y_i - Y_N)}{(Y_D - Y_N)} \quad e \quad 0 \leq d_i \leq 1$$

Verificamos que um valor de d_i próximo de 1 implica que a propriedade física do iésimo intermediário está próximo do estado intermediário (D) e um valor próximo de 0 significa que ela está próxima do estado nativo (N).

A constante de equilíbrio aparente é:

$$K_{ap} = \frac{[{}^n D^n]}{[{}^n N^n]} = \frac{f_{ap}}{(1 - f_{ap})} \quad (6)$$

onde $(1 - f_{ap})$ é a fração aparente do material nativo. Usando as equações (4), (5) e (6) e as constantes de equilíbrio $K_i = f_i / f_N$ e $K_D = f_D / f_N$ obtemos a equação:

$$K_{ap} = \frac{K_D (1 + \sum_i d_i K_i / K_D)}{(1 + \sum_i (1 - d_i) K_i)} \quad (7)$$

Num processo de desnaturação de uma enzima o que se pode medir na realidade é K_{ap} e não K_D . $K_{ap} = K_D$ quando $K_i = 0$, isto é, quando não existe espécies intermediárias de desnaturação. Por comparação entre os dados de desnaturação obtidos por medidas calorimétricas (DSC) e através do tratamento de van'T Hoff feito a partir dos valores de K_{ap} e da temperatura de acordo com a equação:

$$\frac{\partial \ln K_{ap}}{\partial T} = \frac{\Delta H_{van'T Hoff}}{RT^2} \quad (8)$$

foi possível verificar para cada enzima a validade ou não do modelo de dois estados. Para isto, o método sugerido por PRIVALOV (86) é análise numérica da razão $\Delta H_{van'T Hoff} / \Delta H_{DESN}$.

VI.18. CÁLCULOS DA RELAÇÃO $\Delta H_{\text{VAN'T HOFF}} / \Delta H_{\text{DESN}}$

A variação de entalpia de van'T Hoff ($\Delta H_{\text{VAN'T HOFF}}$) foi determinada a partir do coeficiente angular do gráfico $\ln K_{\text{ap}}$ em função de $1/T$. O valor de K_{ap} para cada temperatura foi determinado a partir da área do termograma DSC utilizando o método das pesagens. O termograma foi dividido de cinco em cinco graus.

VI.19. ATIVIDADE DAS ENZIMAS PROTEOLÍTICAS EM FUNÇÃO DO TEMPO

Colocou-se em um elenmeyer 250 ml de tampão fosfato de sódio 0,1 M pH 7,0; 25 ml de uma solução contendo concentração $2 \cdot 10^{-6}$ M de papaína; 25 ml de uma solução contendo 5 mM de cisteína e 1 mM EDTA. Deixou-se esta solução termostalizando a 37°C por vinte minutos e então retirou-se uma alíquota de 5 ml e colocou-se para reagir com 1 ml de substrato caseína N, N'-dimetila 1%. Após trinta minutos interrompeu-se a reação pela adição de 3 ml de TCA 5%, filtrou-se e determinou-se a absorbância a 280 nm do filtrado. Considerou-se a atividade obtida como 100%. Repetindo-se este mesmo procedimento de hora em hora até completar doze horas, comparando-se a atividade encontrada a cada hora com aquela do tempo inicial. O mesmo procedimento foi adotado para as outras proteases nas concentrações $5 \cdot 10^{-6}$ M e $10 \cdot 10^{-6}$ M para quimopapaína B e papaya proteinase respectivamente.

VI.20. DETERMINAÇÃO DA VARIAÇÃO DE ENTALPIA DE PROTEÓLISE ΔH_{PROT}

Para a determinação do ΔH_{PROT} utilizou-se um microcalorímetro TAM (Thermal Activity Monitor), modelo LKB 2277 com cela de perfusão do tipo batelada como esquematizado na Figura 7. Na cela de reação foram colocados 200 μ l de uma solução contendo concentração 18 mg / ml de papaína, 200 μ l de uma solução 5mM de cisteína e 1mM de EDTA, e 1,6ml de tampão fosfato de sódio 0,1M pH 7,0 e deixou-se termostatizar a 37°C. Após o equilíbrio térmico foi feita a calibração elétrica do microcalorímetro. Com o auxílio de um microtitulador previamente calibrado constituído de parafuso micrométrico, seringa e capilar de aço inox, iniciou-se a titulação calorimétrica adicionando-se alíquotas de 16 μ l de solução tampão contendo caseína N, N'-dimetilada 10%. A escala de sensibilidade do registrador nestes experimentos foi de 30 μ watts. O registro do termograma foi feito com o auxílio de um registrador acoplado ao microcalorímetro sendo a velocidade de 0,5 mm/seg e o fundo de escala de 1000 mV. Foram realizados também titulações para descontar o efeito

térmico de diluição da solução da enzima e do substrato no mesmo tampão. O mesmo procedimento foi adotado para as outras proteases nas concentrações 20mg/ml e 24mg/ml para quimopapaína B e papaya proteinase respectivamente.

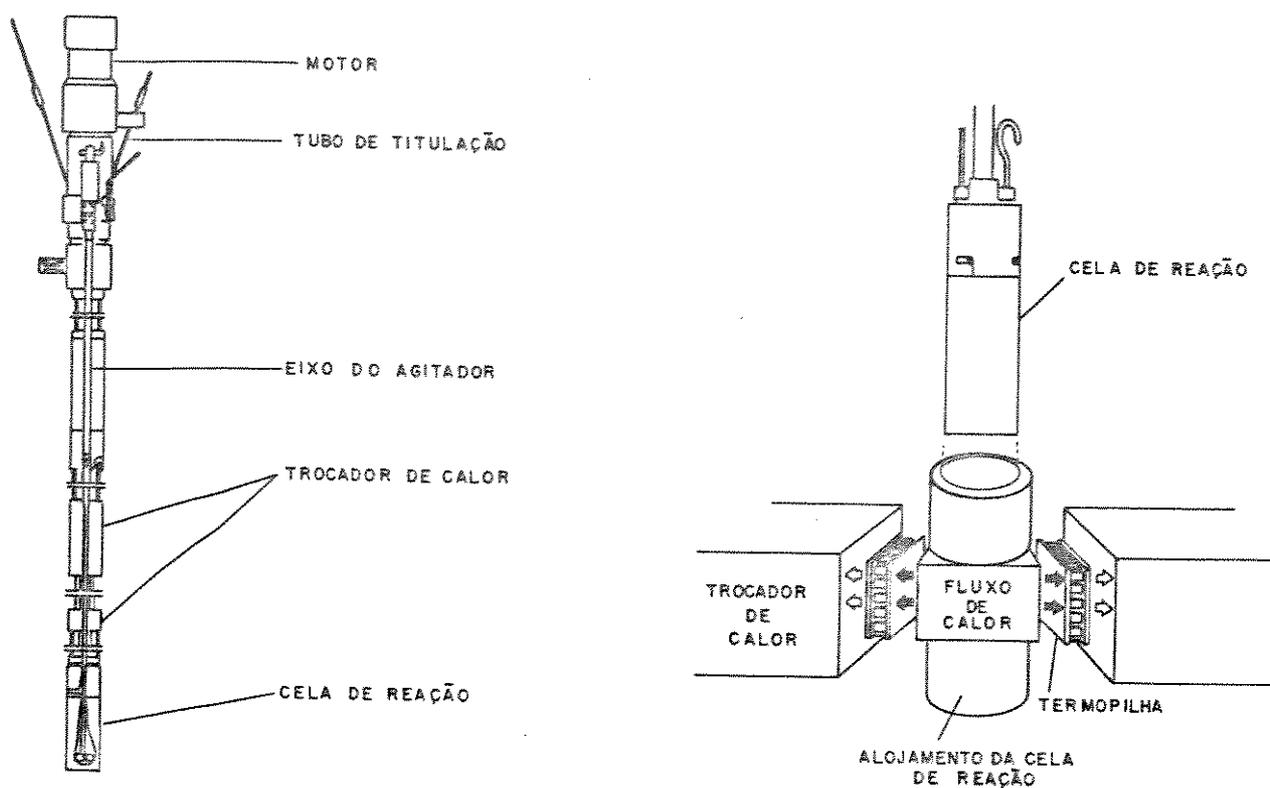


FIGURA 7. Esquema da cela de perfusão do tipo batelada.

VI.21. ANÁLISE DOS DSC.

Os termogramas obtidos a partir das condições experimentais descritas no item VI.20 foram feitas sempre em triplicata e os resultados obtidos neste trabalho apresentaram sempre o mesmo perfil. Para a análise dos termogramas obedecemos ao seguinte procedimento:

1. Sob a curva de calibração elétrica desenhou-se um retângulo e sua área (cm^2) assim como sua massa (g) foram calculadas.

Uma vez que era conhecida a potência (μwatts) e o tempo (segundos), comparou-se a área ou a massa do retângulo com o produto $\mu\text{watts} \cdot \text{segundos} = \mu\text{Joules}$.

2. As áreas dos termogramas e a área da curva de calibração (retângulo) foram comparadas pela técnica de pesagem.
3. Através de uma relação linear comparando-se a área do termograma após cada adição do substrato com a calibração obteve-se o calor de proteólise em mJ.
4. Para cada adição do substrato na solução da enzima, descontamos o valor do calor de diluição da enzima e do substrato no tampão.
5. Após obter-se o valor do calor de proteólise em mJ para cada adição do substrato, construiu-se o gráfico ΣQ (mJ) em função do número de moles do substrato adicionado.

VII. RESULTADOS

VII.1. ANÁLISE DO LÁTEX POR ELETROFORESE EM GEL DE POLIACRILAMIDA

A eletroforese do látex em gel de poliacrilamida demonstrou a existência de 5 componentes proteicos, que migram em direção ao cátodo através de tampão β -alanina 0,34M pH 4,5. Essas proteínas foram numeradas de 1 a 5 na Figura 8, obedecendo o sentido da migração.

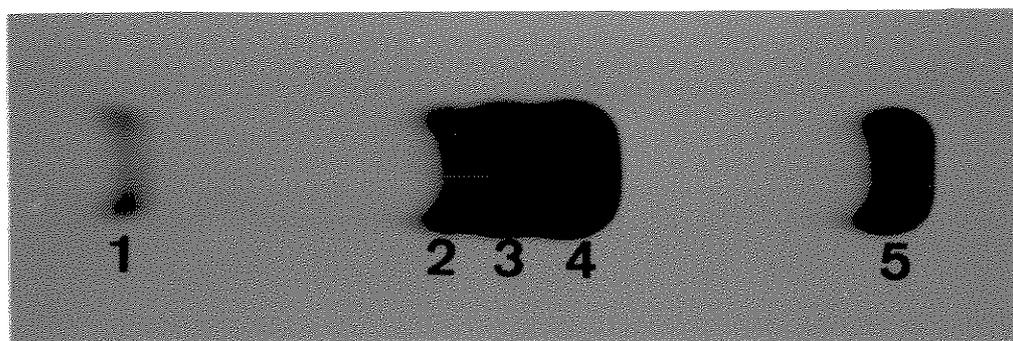


FIGURA 8. Eletroforese em gel de poliacrilamida do látex de mamoeiro. Condições: Material aplicado = 50 μ g de proteína; concentração do gel 15%; tampão β alanina 0,34M pH=4,5; corrente elétrica 50mA; duração oito horas; temperatura ambiente e coloração com Coomassie Brilliant Blue. 1. Papaína; 2. Lisozima; 3. Quimopapaína A; 4. Quimopapaína B; 5. Papaya proteinase.

TABELA II. IDENTIFICAÇÃO DAS BANDAS ELETROFORÉTICAS DAS PROTEÍNAS CONSTITUINTES DO LÁTEX DE *Carica papaya* EM GEL DE POLIACRILAMIDA.

Banda Eletroforética No.	R _F	Identificação
1	0,50	papaína
2	0,59	lisozima
3	0,66	quimopapaína A
4	0,70	quimopapaína B
5	0,79	papaya proteinase

A banda 1 com mobilidade eletroforética relativa de $0,50 \pm 0,03$ foi identificada como papaína; a banda 2 com mobilidade eletroforética de $0,59 \pm 0,04$, como lisozima; as bandas 3 e 4 com mobilidade eletroforética de 0,67 e $0,70 \pm 0,04$, como quimopapaína A e B, respectivamente, e a banda 5 com mobilidade eletroforética de $0,79 \pm 0,05$, como papaya proteinase. Estes resultados foram comparados com os da literatura,

notadamente os de KIM e LEE (125); BASILIO (126); JORGE (127) e BUTTLE et alii (128), estando resumidos na Tabela II.

VII.2. CRITÉRIOS DE PUREZA

As preparações de enzimas foram consideradas puras quando apresentaram uma única banda em gel de poliacrilamida, a 15% (Figuras 9 e 10), bem como atividade proteolítica frente aos substratos estudados.



FIGURA 9. Eletroforese em gel de poliacrilamida do material eluído em CM-Celulose de acordo com os picos da Figura 11.

Condições: Concentração do gel 15%; tampão β alanina 0,34M pH = 4,5; corrente elétrica = 50mA; duração = oito horas; temperatura ambiente e coloração como Coomassie Brilliant Blue.

poço 1 e 9 = látex total 50 μ g de proteína

poço 2 = pico I não apresenta coloração 30 μ g de proteína

poço 8 = pico II papaína 30 μ g de proteína

poço 3 e 4 = pico III lisozima e quimopapaína A 30 μ g de proteína

poço 5 = pico IV quimopapaína A 30 μ g de proteína

poço 6 = pico V quimopapaína B 30 μ g de proteína

poço 7 = pico IV papaya proteinase 30 μ g de proteína

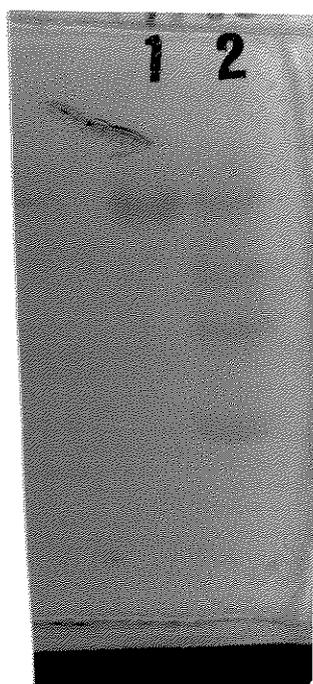


FIGURA 10. Eletroforese em gel de poliacrilamida do material proveniente da purificação da papaína.
Condições: iguais às descritas na Figura 8.
poço 1 = papaína purificada 30 μ g de proteína.
poço 2 = látex total 50 μ g de proteína.

VII.3. RENDIMENTO E ATIVIDADE ESPECÍFICA

A Tabela III contém os resultados de uma das preparações de quimopapaína B e papaya proteinase, reproduzidos com variações mínimas, em outras trinta e cinco preparações semelhantes. O rendimento é de aproximadamente, 39,3% para quimopapaína B e de 48,7% para papaya proteinase.

A Tabela IV contém os valores de uma das purificações de papaína, sendo que realizamos vinte preparações iguais a esta. O rendimento para papaína foi de 10%.

TABELA III. PURIFICAÇÃO DA QUIMOPAPAÍNA B E PAPAYA PROTEINASE A PARTIR DE 30g DO LÁTEX DE MAMOEIRO SECO.

Etapas de Purificação	Volume (ml)	Proteína (a)		Atividade Específica			Fator de Purificação	Rendimento %
		(mg/ml)	total (mg)	U/ml	Total (U)	específica (U/mg)		
Látex total	30,0	107,5	3225,0	113,7	3411,0	1,1	1,0	100,0
Pico V	100,0	6,7	670,0	13,4	1340,0	2,0	1,8	39,3
Pico VI	35,0	13,8	483,0	47,4	1660,0	3,4	3,1	48,7

TABELA IV. PURIFICAÇÃO DA PAPAÍNA A PARTIR DE 30g DO LÁTEX DE MAMOEIRO SECO.

Etapas de Purificação	Volume (ml)	Proteína (a)		Atividade Específica			Fator de Purificação	Rendimento %
		(mg/ml)	total (mg)	U/ml	Total (U)	específica (U/mg)		
Látex total	110,0	41,3	4543,0	43,4	4774,0	1,1	1,0	100,0
Sobrenadante	109,5	28,3	3099,0	29,9	3274,1	1,1	1,0	68,6
Precipitação c/ 45% de sulfato de amônio	51,0	7,1	362,0	14,2	724,2	2,0	1,8	15,2
Precipitação c/ 40% de sulfato de amônio	19,5	9,2	179,4	30,7	598,1	3,3	3,0	12,5
Precipitação c/ NaCl	10,0	12,9	129,0	47,7	477,0	3,7	3,4	10,0

(a) proteína foi dosada pelo método de LOWRY.

VII.4. ANÁLISE CROMATOGRÁFICA E ELETROFORÉTICA DO LÁTEX DO MAMOEIRO

A Figura 11 apresenta o perfil cromatográfico obtido por análise do extrato de látex de acordo com o descrito na parte experimental. O perfil cromatográfico mostra que a CM-celulose é uma excelente resina para o fracionamento das proteínas do látex, uma vez que seu perfil de eluição cromatográfica revela a existência de cinco picos protéicos (de II a VI Figura 11), que devem corresponder às seguintes proteinases: II papaína; III lisozima + quimopapaína A; IV quimopapaína A; V quimopapaína B e VI papaya proteinase. Esta identificação foi feita por comparação com vários resultados da literatura, entre os quais destacam-se os de: JORGE (127); BASILIO (126); BUTTLE et alii (128); LEE e KIM (129) e JACQUET et alii (50) e por análise eletroforética do material reunido, concentrado e submetido a eletroforese (Figura 9), comparado com a eletroforese do extrato total do látex apresentado na Figura 8, e os valores de migração eletroforética relativos (RF) reunidos na Tabela II comparados com a Tabela V.

Como pode-se observar pela Figura 11 e dos resultados eletroforéticos (Figura 9) conseguiu-se, através desse procedimento, uma purificação muito eficiente para a quimopapaína B e papaya proteinase.

TABELA V. RESULTADOS ELETOFORÉTICOS DAS PROTEASES PRESENTES NO LÁTEX DO MAMOEIRO ELUIDOS POR TAMPÃO ACETATO DE SÓDIO PH 5,0 COM CONCENTRAÇÕES CRESCENTES EM COLUNA CONTENDO CM-CELULOSE.

Picos	Eletroforese resultados	R _F	Identificação
I	--	--	
II	1 banda	0,50	papaína
III	2 bandas	0,58	lisozima
		0,66	quimopapaína A
IV	1 banda	0,66	quimopapaína A
V	1 banda	0,70	quimopapaína B
VI	1 banda	0,79	papaya proteinase

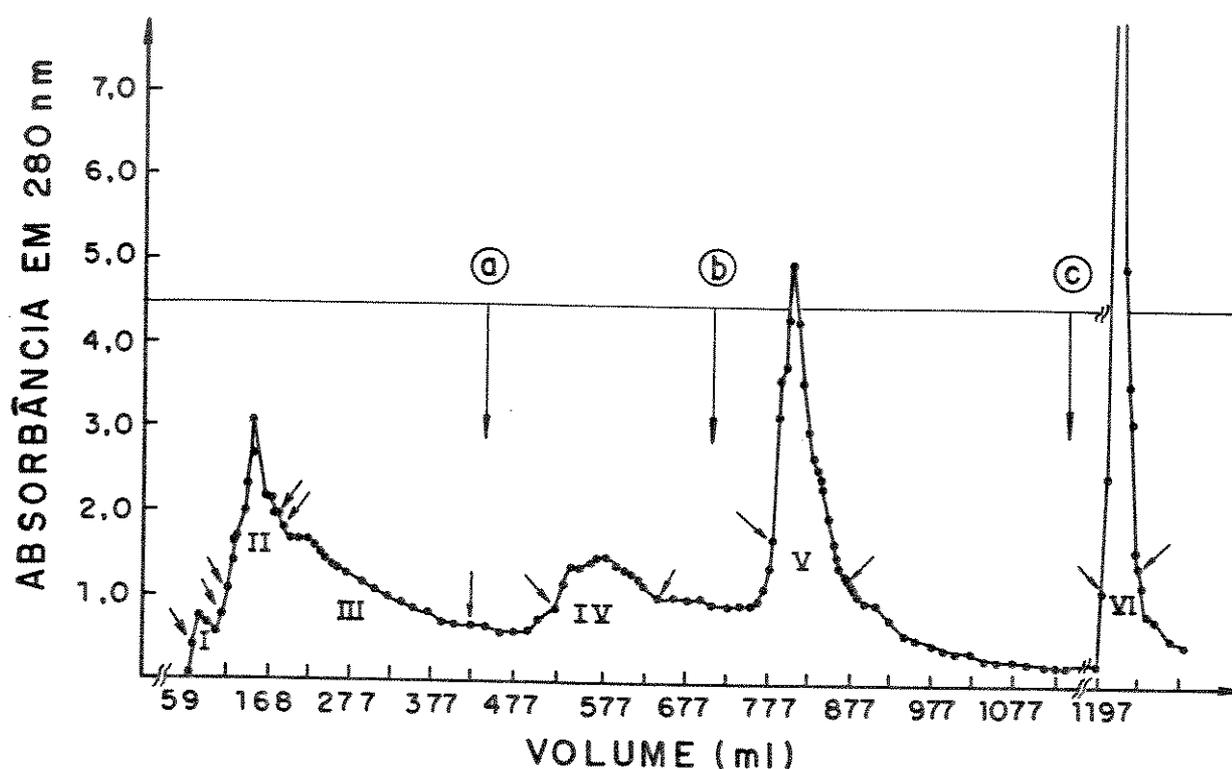


FIGURA 11. Cromatografia em CM-Celulose do látex do mamoeiro. Condições: Material aplicado 3200mg de proteína; dimensões da coluna 30 x 1,5cm; fluxo 60ml por hora; volume de cada fração 5ml; temperatura 25°C. Os valores compreendidos entre as setas foram reunidos, dialisados contra água destilada, liofilizados e analisados por eletroforese em gel de poliácridamida a 15%. Tampão de eluição: tampão acetato de sódio, pH 5,0 nas seguintes concentrações: do início até a 0,4M de a até b 0,5M; de b até c 0,8M, de c até o final 1,0M. Picos II papaína, III lisozima e quimopapaína A, IV quimopapaína A, V quimopapaína B, e VI papaya proteinase.

VII.5. ANÁLISE DA PURIFICAÇÃO DA PAPAÍNA

O método utilizado para purificar a papaína difere totalmente dos métodos clássicos descritos na literatura, apresentando a vantagem de ser relativamente simples e não envolver o uso de reagentes que possam alterar as propriedades estruturais nativas da enzima, entre eles o DTT, cisteína, β -mercaptoetanol entre outros, além de não submeter a enzima à cromatografia.

As preparações de papaína foram consideradas puras após a cristalização a 4°C por 18 horas, quando apresentaram uma única banda eletroforética em gel de poliacrilamida a 15% (Figura10).

VII.6. CARACTERIZAÇÃO CINÉTICA DAS PROTEASES DO LÁTEX

VII.6.1. Atividade Esterolítica

Os estudos cinéticos foram realizados com os substratos sintéticos: Z-ala-pNP e BAEE, devido a rapidez e facilidade na preparação e execução destes experimentos.

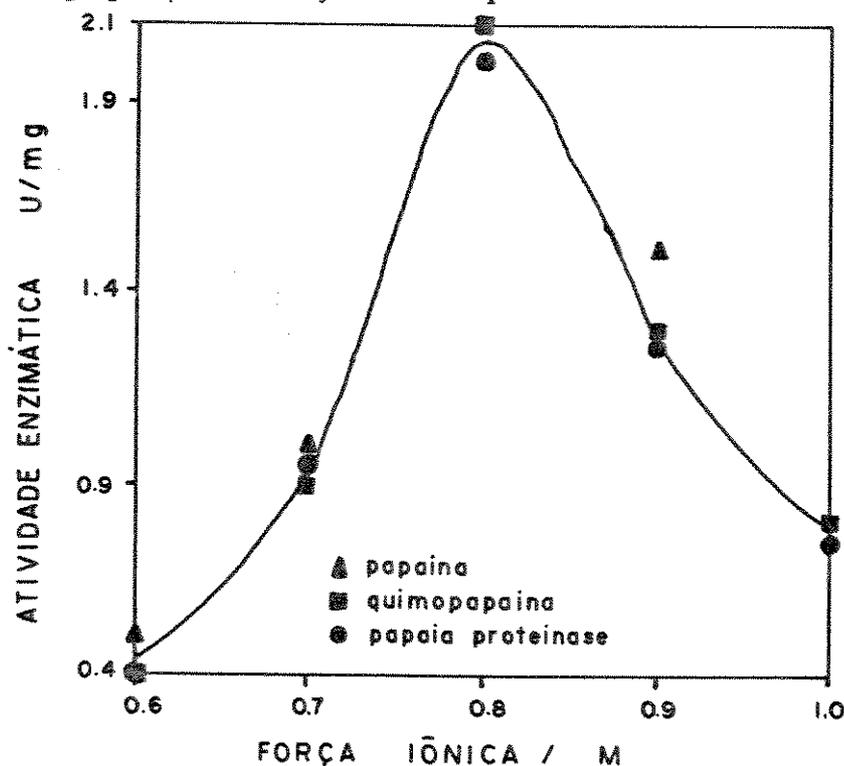


FIGURA 12 . Atividade enzimática em função da força iônica.

Condições: Tampão fosfato de sódio 0,1M pH 7,0 com força iônica variando de 0,6 até 1,0M com KCl; acetonitrila 6,7%; temperatura 25°C; cisteína 5 mM e EDTA 1mM. Foi colocada para termostatar com as enzimas (papaina, quimopapaina B e papaia proteinase) contendo uma concentração de $2 \cdot 10^{-8}$ M. Iniciou-se a leitura de absorbância a 400 nm de 30 em 30 segundos no espectrofômetro.

Inicialmente foi observado que, à medida que aumentávamos a força-iônica, obtínhamos uma maior atividade, até um ótimo de força-iônica de 0,8M cloreto de potássio e depois começava a declinar (Figura 12). Observamos também que a hidrólise do substrato Z-ala-pNP aumentava com o passar do tempo de reação, fato demonstrado na Figura 13. Como pode ser observado, após 6 a 7 minutos, a atividade das proteases aumentou nitidamente em relação aos minutos iniciais. Para efeito de cálculo a hidrólise inicial deste substrato foi desprezada.

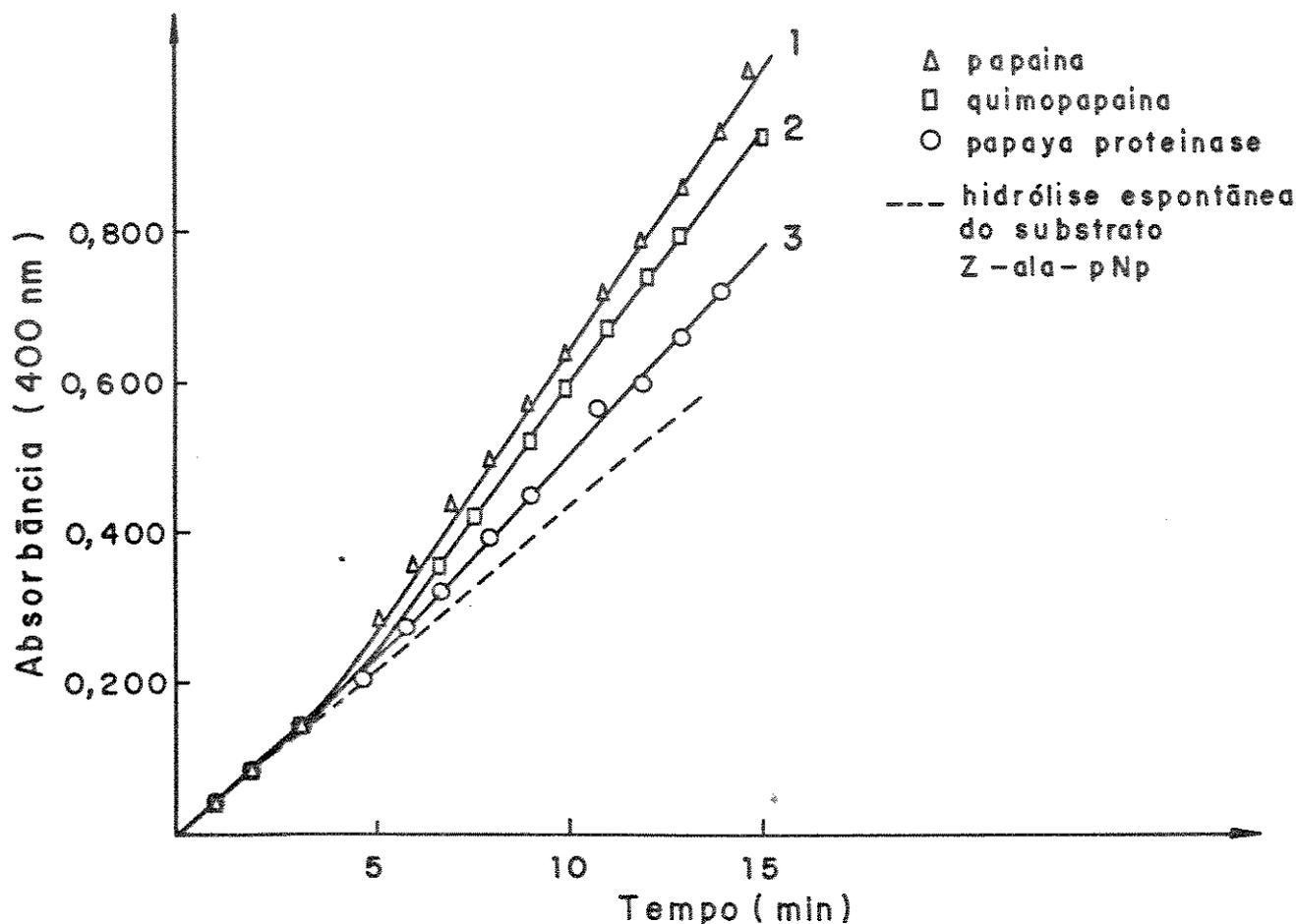


FIGURA 13. Atividade esterolítica apresentada pelas proteases do látex.

Condições: Tampão fosfato de sódio 0,1M pH 7,0 com força iônica ajustada para 0,8M com KCl; acetonitrila 6,7%; temperatura 25°C; cisteína 5mM e EDTA 1mM. As demais condições são iguais as da Figura 12.

Na Tabela VI estão contidos os valores dos parâmetros cinéticos das enzimas, para o substrato BAEE, sendo que a papaina e quimopapaina B apresentam valores aproximadamente iguais, enquanto a papaya proteinase revela um valor dez vezes menor, ou seja uma maior afinidade para este substrato. Para o substrato Z-ala-pNP, as

enzimas papaína e quimopapaína B demonstram K_M próximos a $3,8 \times 10^{-6} M$, entretanto, a papaya proteinase apresenta um K_M até dez vezes maior. Quando comparamos os valores de K_M para os dois substratos, de cada enzima, notamos que para o substrato BAEE as proteases estudadas apresentaram um K_M em relação a esse substrato cerca de mil vezes maior, do que o Z-ala-pNP indicando que as proteases do látex têm menor afinidade pelo BAEE do que para o Z-ala-pNP.

VII.6.2. Atividade Proteolítica

O estudo da reação enzima-substrato foi fundamental para testar o método de purificação das enzimas, assim como uma avaliação do procedimento para obtenção do látex.

Neste trabalho, como matéria-prima, utilizamos o látex do mamoeiro seco ao sol para obtenção das proteases, e com base nos resultados cinéticos, constatamos que este método rudimentar de desidratação do látex não altera a estrutura nativa destas enzimas, mantendo sua atividade.

Os dados experimentais da cinética enzimática para as proteases papaína, quimopapaína B e papaya proteinase em solução utilizando como substrato a caseína N, N'-dimetilada estão representados respectivamente nas Figuras 14 e 15. Os parâmetros cinéticos K_M e $V_{m\acute{a}x}$ para as proteases foram obtidos pelo método de HANES (123) a partir dos dados experimentais e estão respectivamente representados nas Figuras 16, 17 e 18 para papaína, quimopapaína B e papaya proteinase. Para os outros substratos o procedimento foi idêntico. Através dos resultados da tabela VI, observamos que as enzimas apresentam diferentes afinidades pelos substratos estudados. Para o substrato caseína tipo Hammrsten, papaína e quimopapaína B apresentam um valor de K_M próximo, e papaya proteinase apresenta um K_M cerca de dez vezes maior quando comparado com as outras duas proteases. Para a caseína N, N'-dimetilada, as enzimas apresentaram o seguinte comportamento: quimopapaína B apresentou um K_M duas vezes menor que o da papaína; papaya proteinase apresentou um K_M cerca de dez vezes maior que o da quimopapaína B e quatro vezes maior que o da papaína.

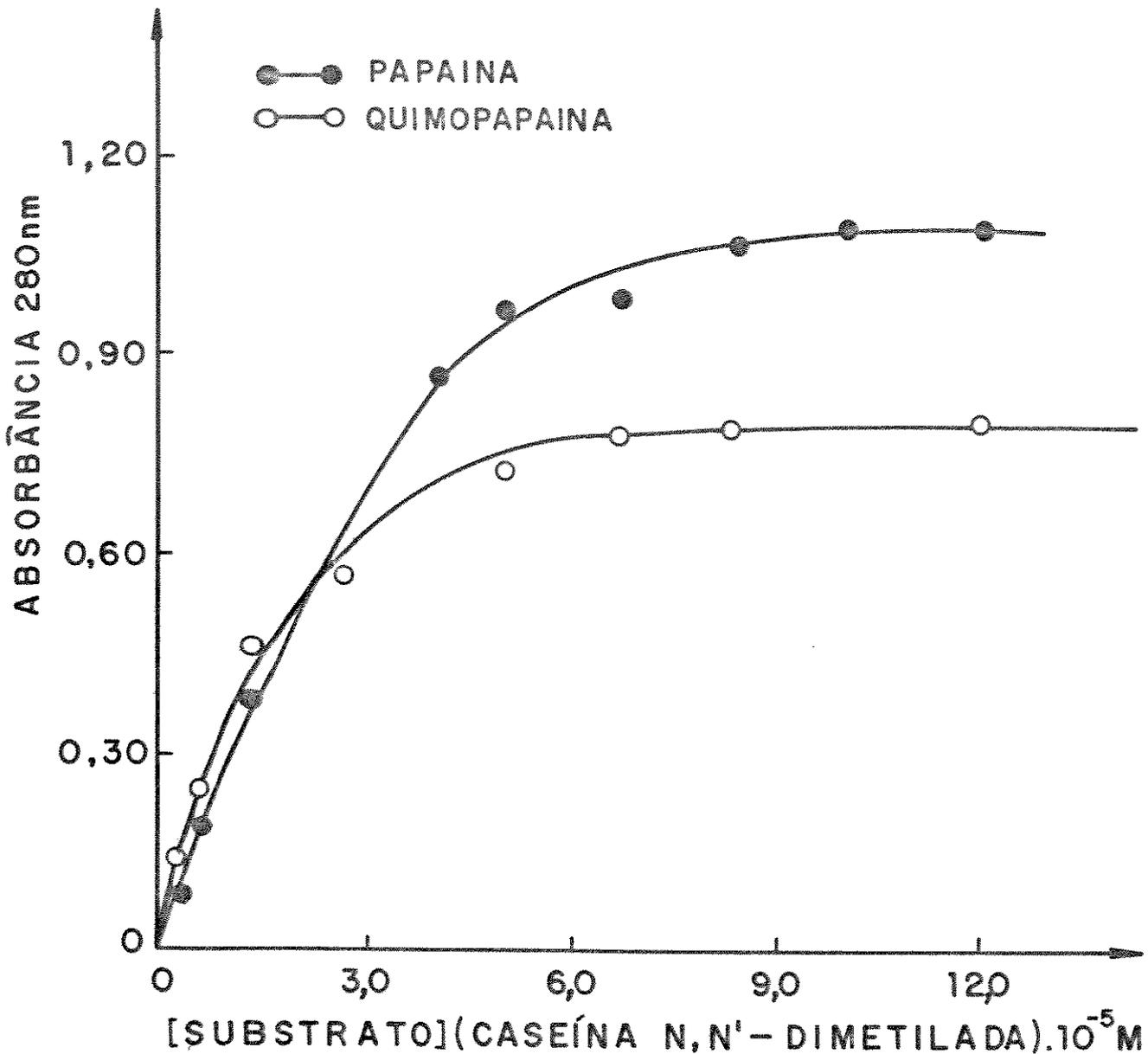


FIGURA 14. Curva de saturação das enzimas papaína e quimopapaína B pelo substrato caseína N,N'-dimetilada segundo Michaelis-Menten.

Condições: Uma alíquota contendo uma concentração de $5 \cdot 10^{-6}$ M em tampão fosfato de sódio 0,1M pH 7,0; 5 mM de cisteína e EDTA 1 mM; foram colocadas para termostatar a 37°C durante vinte minutos. Após acrescentou-se o substrato caseína N,N'-dimetilada; reagiu durante trinta minutos. Interrompeu-se a reação com a adição de TCA a 5%. Em seguida filtrou-se a suspensão obtida e determinou-se a leitura a 280 nm. Para os demais substratos adotou-se sempre o mesmo tratamento matemático.

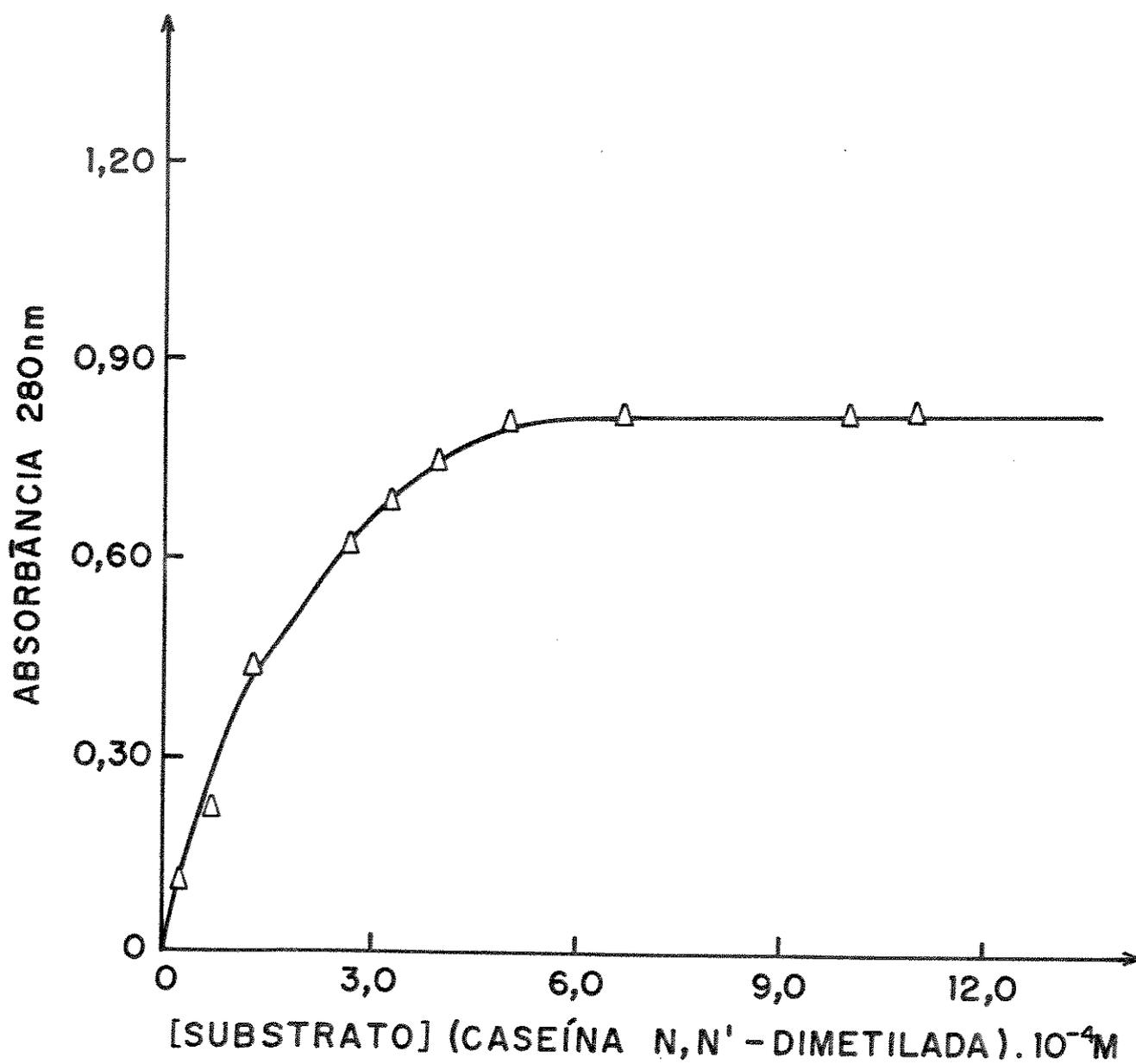


FIGURA 15. Curva de saturação da enzima papaya proteinase pelo substrato caseína N,N'-dimetilada segundo Michaelis-Menten.
Condições: idem Figura 14.

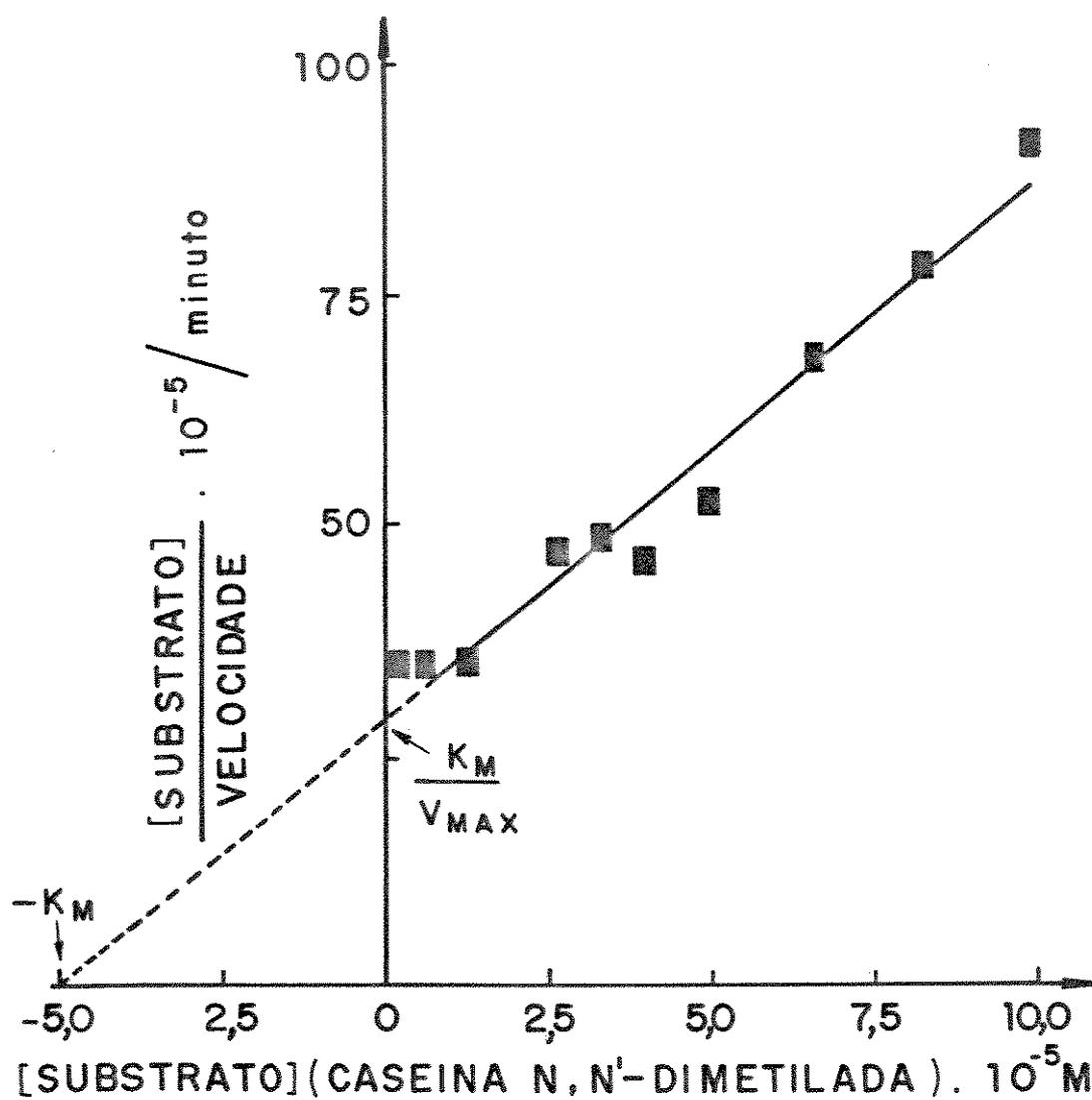


FIGURA 16. Gráfico construído segundo HANES para a papaína utilizando-se como substrato a caseína N,N'-dimetilada 1%.

Condições: idem Figura 14.

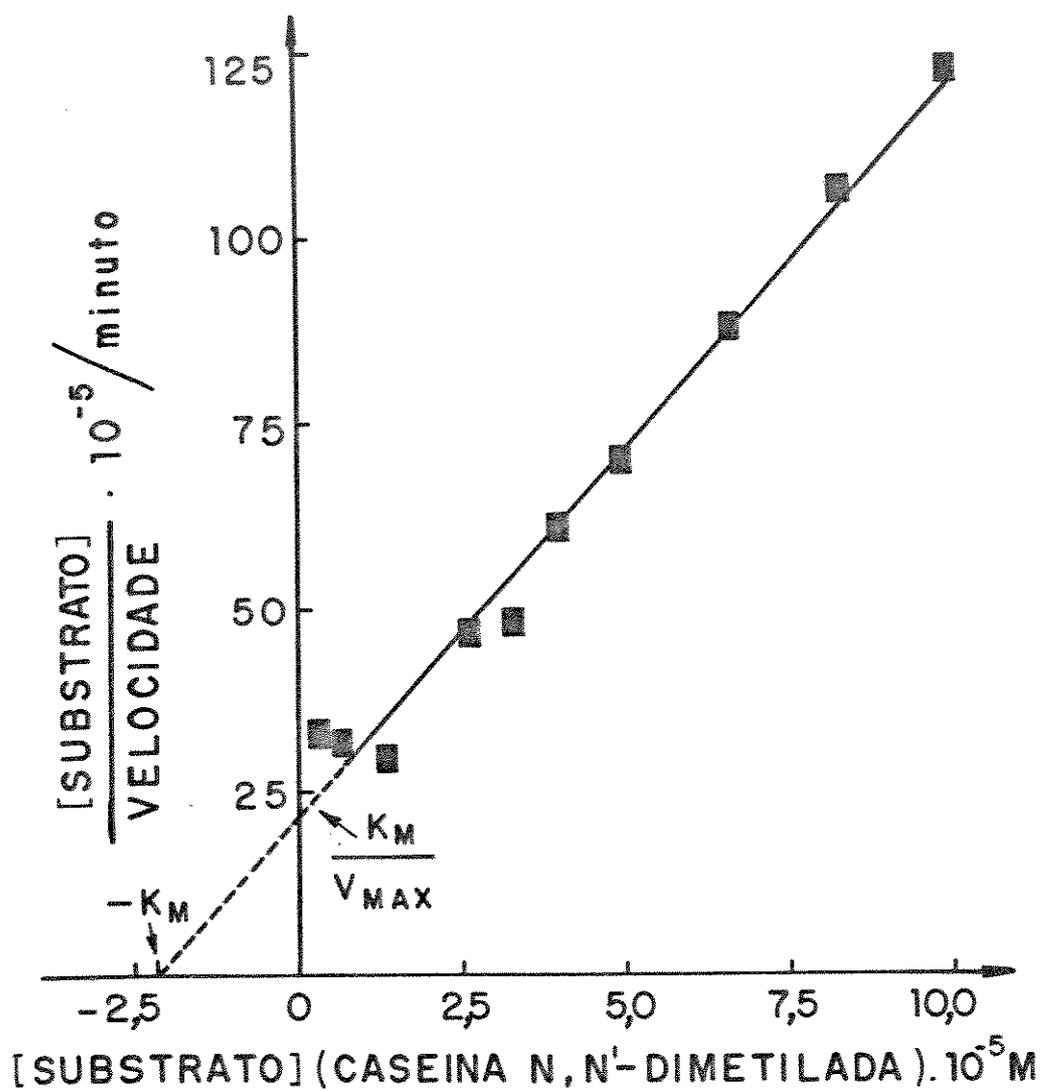


FIGURA 17. Gráfico construído segundo HANES para a quimopapaína B utilizando-se como substrato a caseína N,N'-dimetilada 1%.
Condições: idem Figura 14

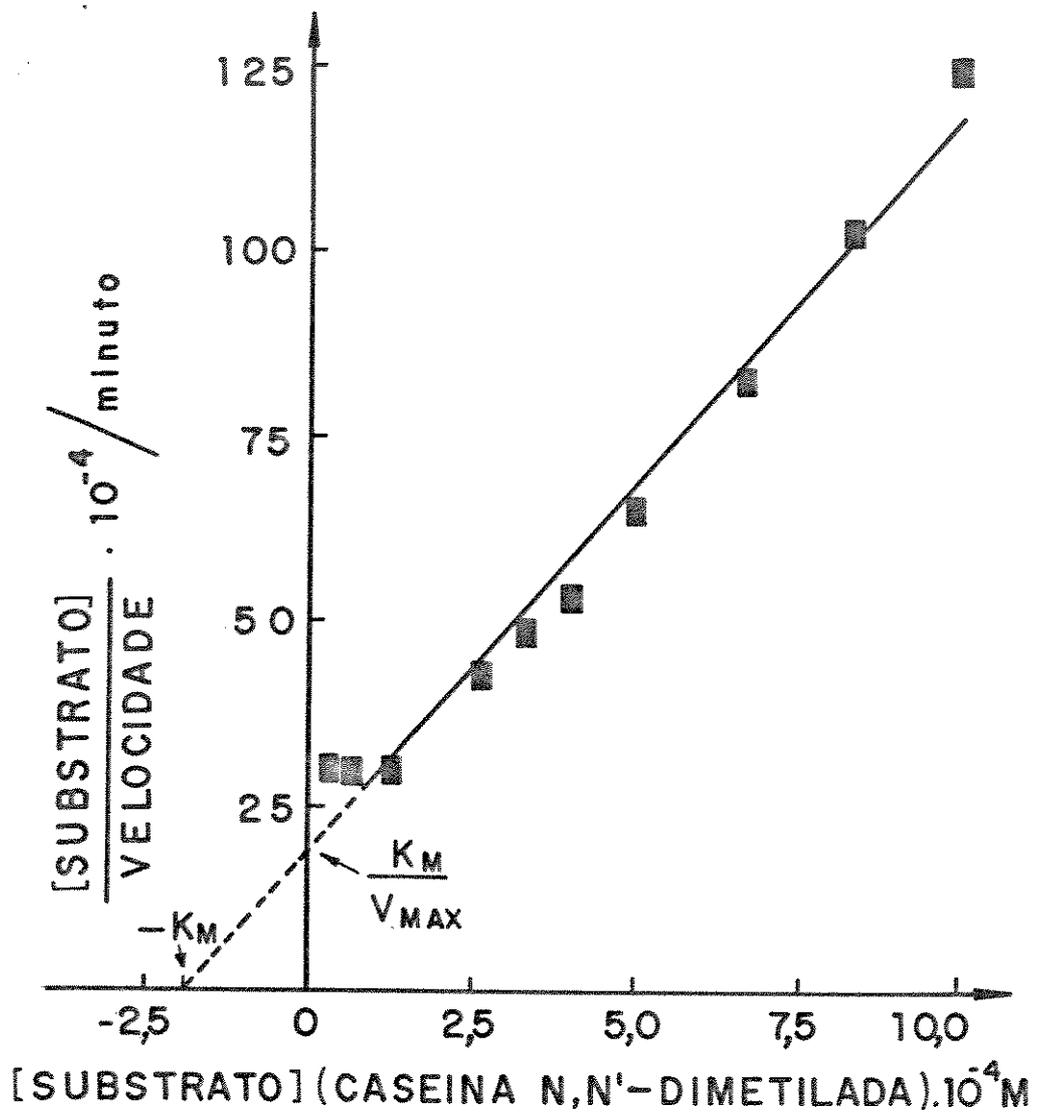


FIGURA 18. Gráfico construído segundo HANES para a papaya proteinase utilizando-se como substrato a caseína N,N'-dimetilada 1%.
Condições: idem Figura 14.

VII.7. CONTROLE DA CASEÍNA N, N'-DIMETILADA

A caseína N, N'-dimetilada preparada em nosso laboratório foi comparada com a da Sigma, através dos seguintes testes: realização de eletroforese em gel de poliacrilamida a 12% em sistema desnaturante (SDS) (Figura 37); espectro infra-vermelho; RMN; e determinação dos aminoácidos (ver Apêndice).

VII.8. pH ÓTIMO DAS PROTEASES IMOBILIZADAS

O efeito do pH sobre a atividade das proteinases do látex foi avaliado usando-se como substrato a caseína N, N'-dimetilada a 1%. As enzimas mostraram com pequenas variações um máximo de atividade a pH 7,0, e pouca atividade no pH 4,0 e pH 8,0 (Figura 19).

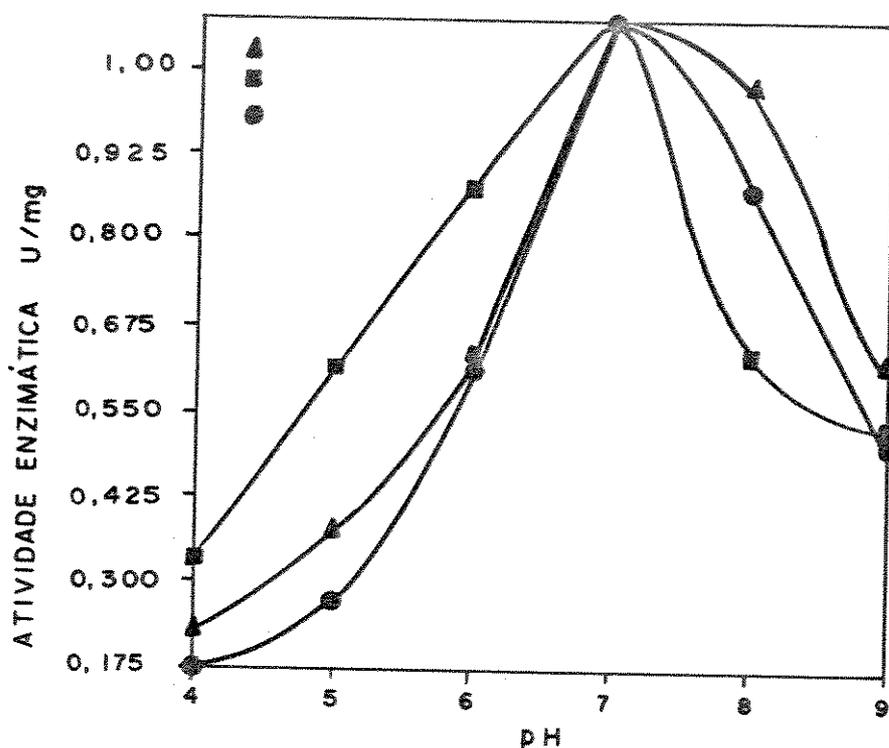


FIGURA 19. Atividade proteolítica apresentada pelas proteases do látex imobilizadas em função do pH. Condições: Pesou-se 0,22 g de sílica gel silanizada e com as respectivas enzimas imobilizadas; colocou-se em um elemeyer com tampões variando-se o pH : Tampão acetato de sódio 0,1 M pH 4,0 e 5,0; tampão fosfato de sódio pH 6,0 e 7,0 e tampão tris HCl pH 8,0 e 9,0. Foi adicionado uma solução de 5 mM de cisteína e 1 mM de EDTA. Deixou-se termostatizar por vinte minutos, em seguida adicionou-se o substrato caseína N, N'-dimetilada 1% durante 30 minutos. A reação foi interrompida com a adição de TCA 5%, a suspensão obtida foi filtrada e determinou-se a absorbância a 280 nm.

VII.9. CINÉTICA ENZIMÁTICA DAS ENZIMAS IMOBILIZADAS

A cinética enzimática para as três enzimas imobilizadas foi feita, utilizando-se como substrato a caseína N,N'-dimetilada a 1%. Os resultados experimentais da cinética enzimática para as proteases imobilizadas papaína e quimopapaína B e papaya proteinase estão representadas na Figuras 22 e 23 respectivamente. Os parâmetros cinéticos K_M e $V_{m\acute{a}x}$ foram calculados como descritos anteriormente. A papaína apresentou um K_M menor do que a quimopapaína B e papaya proteinase, portanto, uma maior afinidade como representados nas Figuras 22, 23 e 24 respectivamente. Os valores dos parâmetros cinéticos obtidos estão resumidos na Tabela VI.

Após a imobilização, a seguinte quantidade de enzima ficou aderida por grama de sílica: papaína 10 mg; quimopapaína 6 mg e papaya proteinase 8 mg. Quando comparamos os valores de K_M para o substrato caseína N,N'-dimetilada para cada uma das três enzimas na forma solúvel e imobilizada, observa-se que o K_M da forma imobilizada é cinco vezes maior, para a papaína, cem vezes maior para a quimopapaína B e a papaya proteinase. Comparando-se o valor de K_M para as três enzimas, imobilizadas, deduzimos que o valor de K_M para a quimopapaína B e papaya proteinase é da ordem de 10^{-4} M e o K_M para papaína é cerca de dez vezes menor. Em todos os casos ocorreu uma elevação do valor de K_M das enzimas imobilizadas em relação as enzimas livres, indicando que a imobilização diminuiu a afinidade destas enzimas pelo substrato (caseína N, N'-dimetilada), ou seja, é necessário maior concentração de substrato para se obter metade da velocidade máxima.

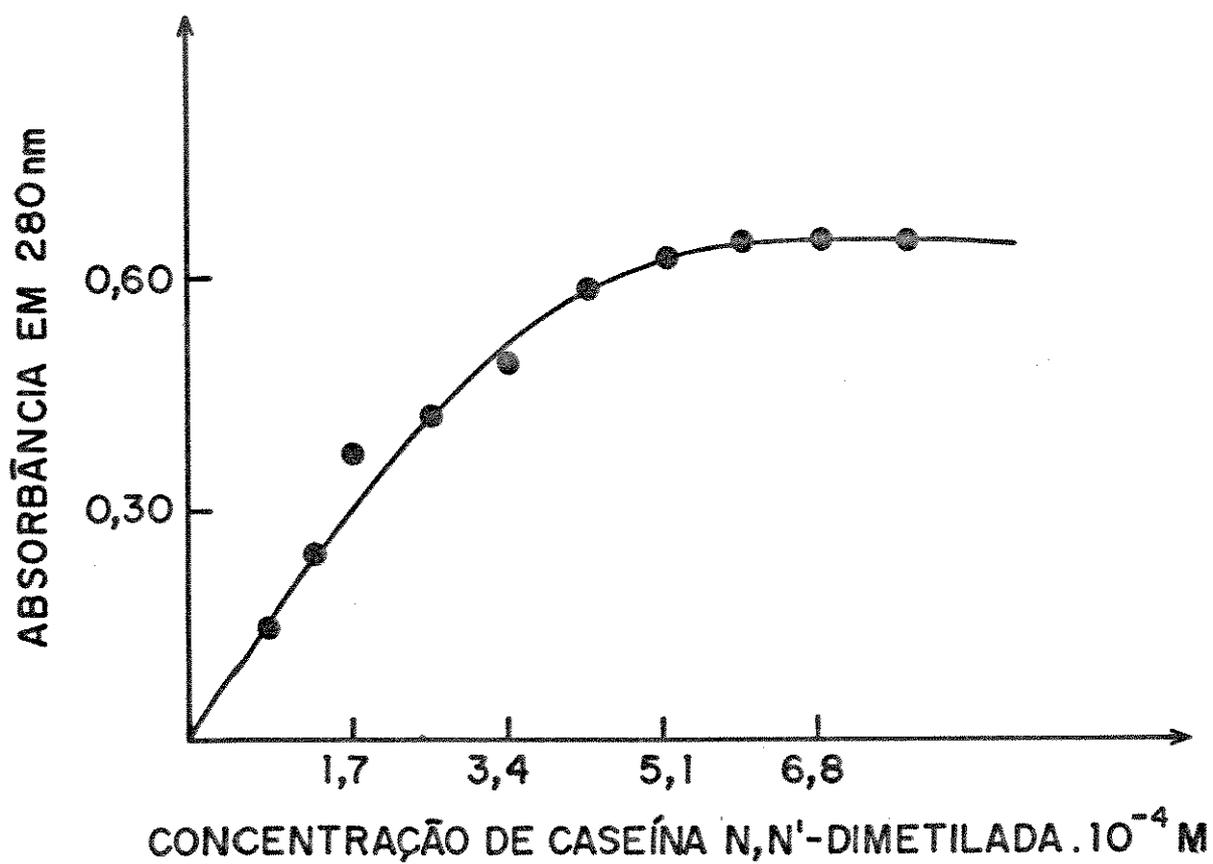


FIGURA 20. Curva de saturação para a enzima papaína, utilizando-se a caseína N, N'-dimetilada segundo o comportamento de Michaelis-Menten. Condições: 0,22g de sílica gel contendo papaína imobilizada foi colocada em um erlenmeyer com tampão fosfato de sódio 0,1M pH 7,0; cisteína 5mM e EDTA 1mM. Após termostatização a 37°C, adicionou-se caseína N,N'-dimetilada 1%, esperou-se 30 minutos. Retirou-se uma alíquota de 5ml e adicionou-se 5ml de TCA 5%, filtrou-se e realizou-se a leitura a 280nm.

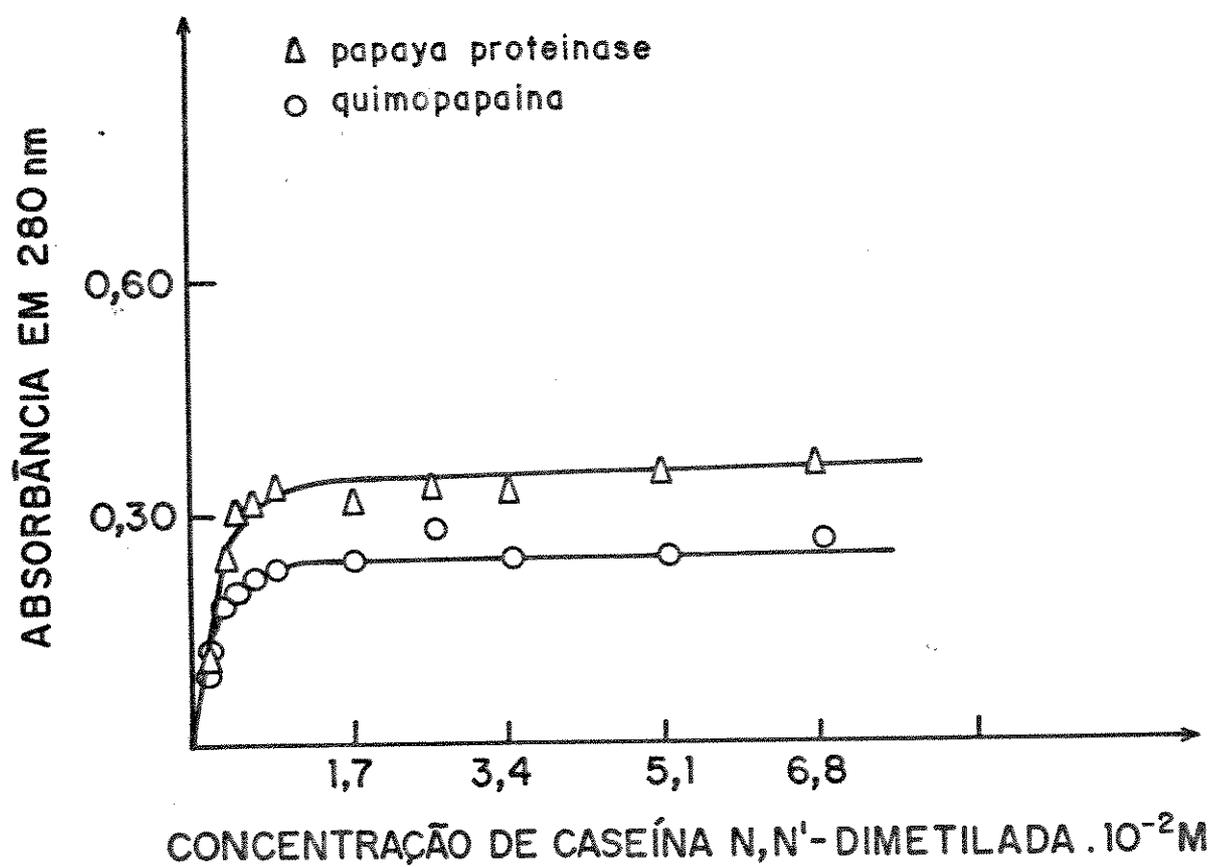


FIGURA 21. Curva de saturação para as enzimas quimopapaína e papaya proteinase, utilizando-se a caseína N, N'-dimetilada segundo o comportamento de Michaelis-Menten. Condições: ídem as da Figura 20.

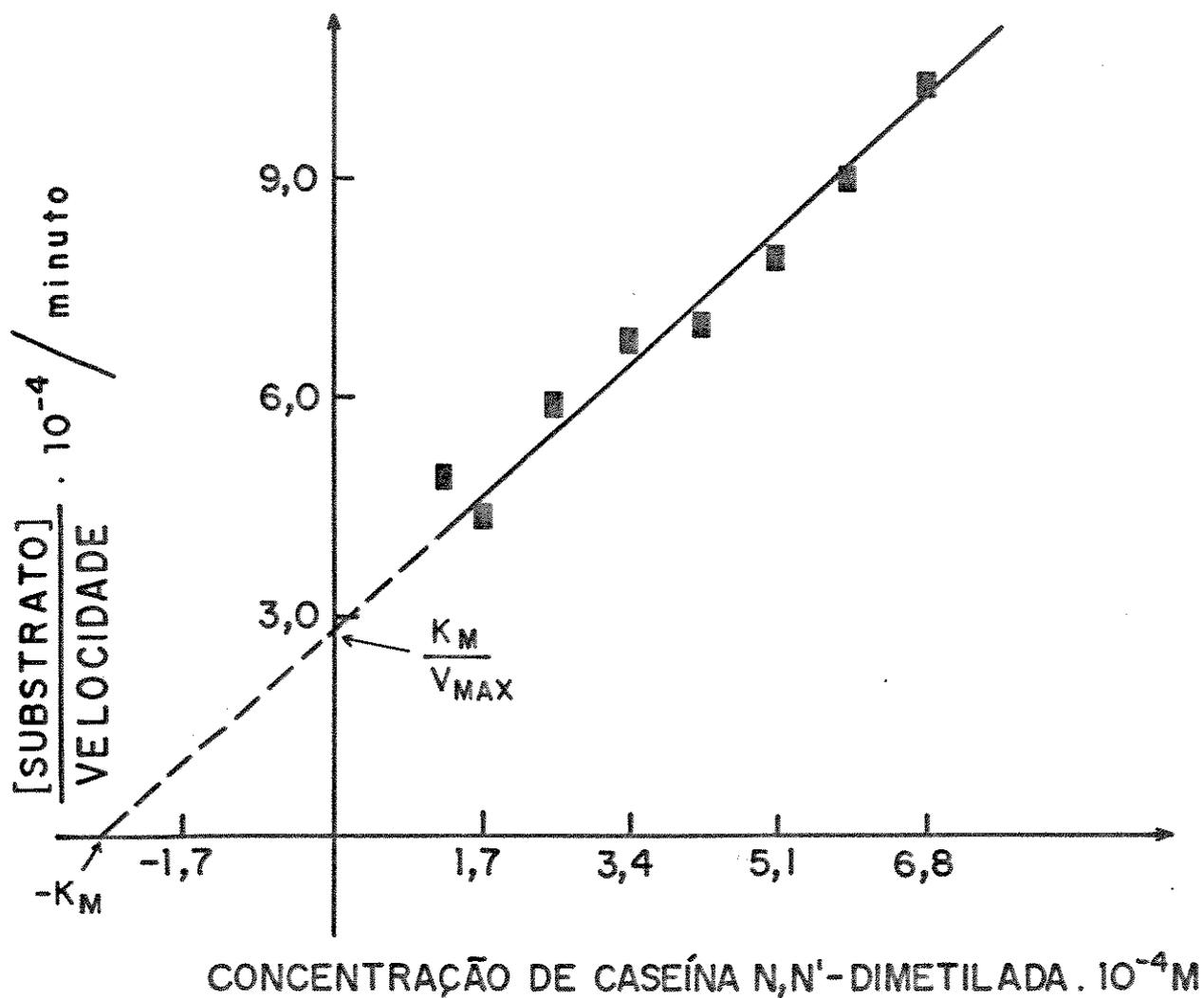


FIGURA 22. Gráfico construído segundo HANES para a papaína imobilizada sob sílica gel usando como su substrato caseína N,N'-dimetilada a 1%.
Condições: são iguais às descritas na Figura 20.

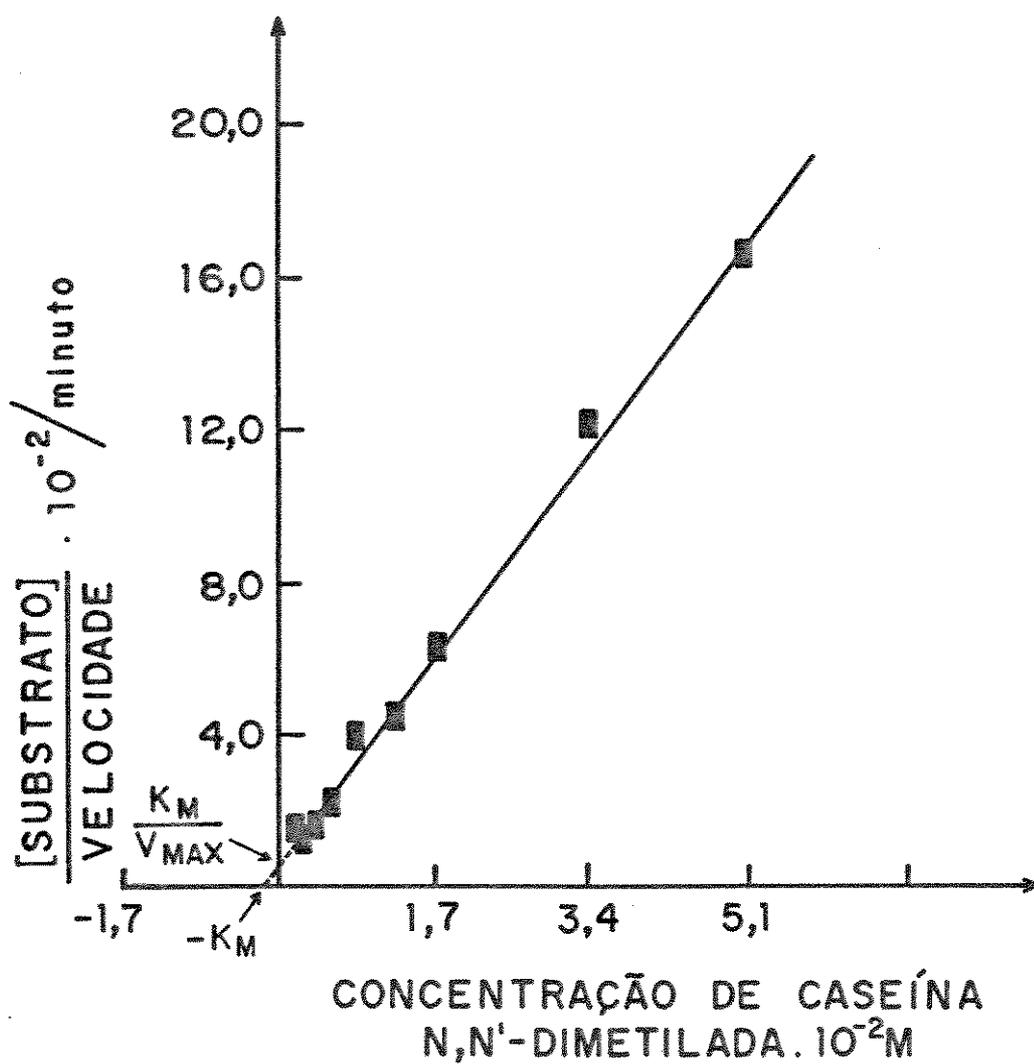


FIGURA 23. Gráfico construído HANES para a quimopapaína B immobilizada sob sílica gel usando como substrato caseína N,N'-dimetilada a 1%. Condições: são iguais às descritas na Figura 20, com exceção da enzima, que era a quimopapaína.

TABELA VI. PARÂMETROS CINÉTICOS DAS ENZIMAS PROTEOLÍTICAS PRESENTES NO LÁTEX DE *Carica papaya*.

Enzimas	Substrato	$V_{\text{máx}}$ $\text{mols.l}^{-1}.\text{min}^{-1}$	K_M (M)
papaína	Caseína tipo Hammrsten	$1,4 \cdot 10^{-1}$	$23,0 \cdot 10^{-6}$
	Caseína N,N'-dimetilada	$1,9 \cdot 10^{-1}$	$49,0 \cdot 10^{-6}$
	BAEE	$6,8 \cdot 10^{+1}$	$23,0 \cdot 10^{-3}$
	Z-ala-pNP	$8,8 \cdot 10^{-3}$	$3,8 \cdot 10^{-6}$
papaína (a)	Caseína N,N'-dimetilada	$9,2 \cdot 10^{-1}$	$25,0 \cdot 10^{-5}$
quimopapaína	Caseína tipo Hammrsten	$1,1 \cdot 10^{-1}$	$31,0 \cdot 10^{-6}$
	Caseína N,N'-dimetilada	$1,1 \cdot 10^{-1}$	$21,0 \cdot 10^{-6}$
	BAEE	$7,0 \cdot 10^{+1}$	$22,0 \cdot 10^{-3}$
	Z-ala-pNP	$3,7 \cdot 10^{-3}$	$3,9 \cdot 10^{-6}$
quimopapaína (a)	Caseína N,N'-dimetilada	$3,1 \cdot 10^{-1}$	$25,0 \cdot 10^{-4}$
papaya proteinase	Caseína tipo Hammrsten	$3,3 \cdot 10^{-1}$	$10,0 \cdot 10^{-5}$
	Caseína N,N'-dimetilada	$1,1 \cdot 10^{-1}$	$19,0 \cdot 10^{-5}$
	BAEE	$4,0 \cdot 10^{+1}$	$2,0 \cdot 10^{-3}$
	Z-ala-pNP	$8,3 \cdot 10^{-3}$	$4,0 \cdot 10^{-5}$
papaya proteinase (a)	Caseína N,N'-dimetilada	$4,1 \cdot 10^{-1}$	$33,0 \cdot 10^{-4}$

(a) enzima imobilizada

Condições: Os parâmetros cinéticos foram obtidos das figuras construídas segundo o tratamento de HANES para cada uma das proteinases estudadas.

VII.10. ESTABILIDADE DAS PROTEASES DO LÁTEX DO MAMOEIRO IMOBILIZADAS EM FUNÇÃO DO TEMPO

Como pode-se deduzir pela observação da Figura 25, o método de imobilização – utilizando como suporte o vidro silanizado tratado com glutaraldeído – foi muito eficiente, pois permitiu conservar 100% da atividade por oito meses após a imobilização.

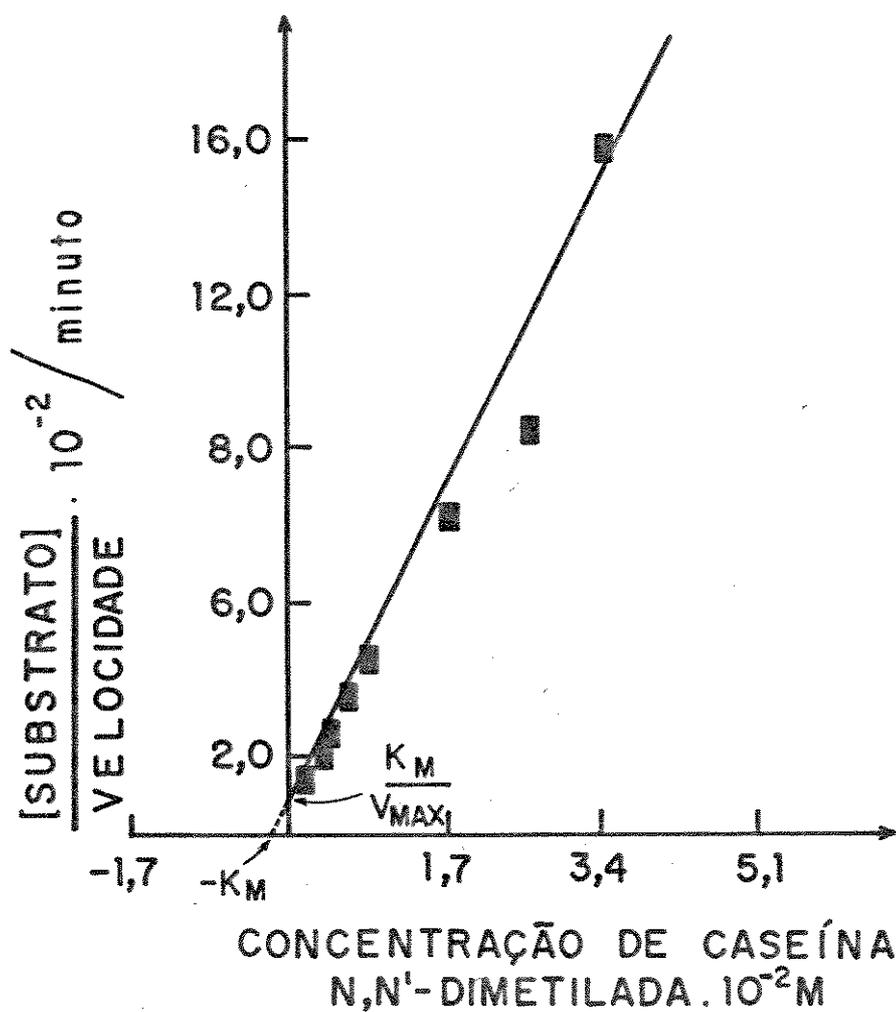


FIGURA 24. Gráfico construído segundo HANES para a papaya proteinase immobilizada sob sílica gel usando como substrato caseína N,N'-dimetilada a 1%. Condições: são iguais às descritas na Figura 20, com exceção da enzima, que era a papaya proteinase.

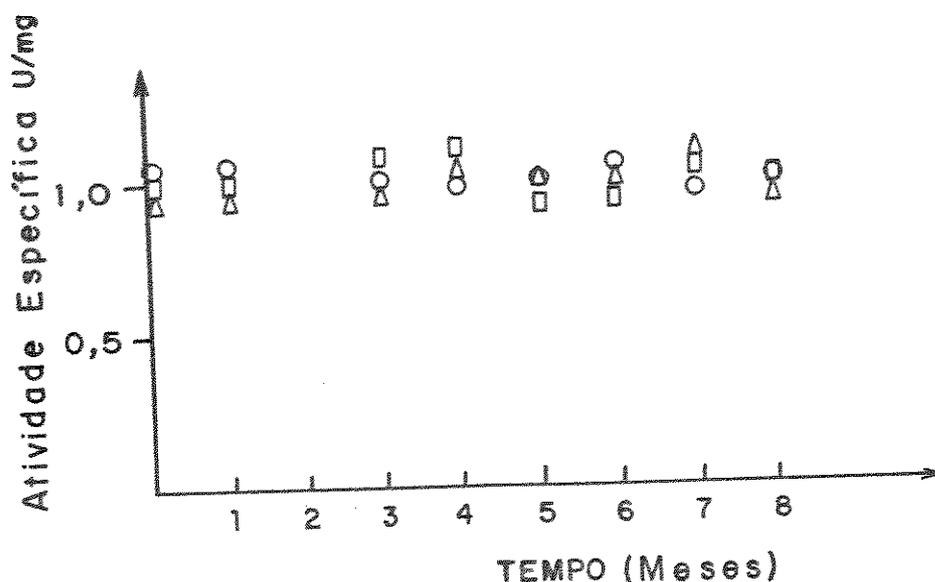


FIGURA 25. Determinação da atividade das enzimas immobilizadas.
 Condições: Uma vez por mês realizou-se testes enzimáticos para verificar a atividade enzimática conforme descrito na Figura 20.
 (○) papaiína; (□) quimopapáína; (△) papaya proteinase.

VII.11. ESTABILIDADE DAS PROTEASES DO LÁTEX DO MAMOEIRO EM SOLUÇÃO EM FUNÇÃO DO TEMPO

O perfil da estabilidade das proteases em tampão fosfato de sódio 0,1M pH 7,0 a 37 C em função do tempo está apresentada na Figura 26. A atividade da papaya proteinase decresceu 80% durante um mês; a atividade da quimopapáína B decaiu cerca de 40%; e da papaiína, 22%. As enzimas immobilizadas mantiveram 100% da atividade durante o mesmo período estudado.

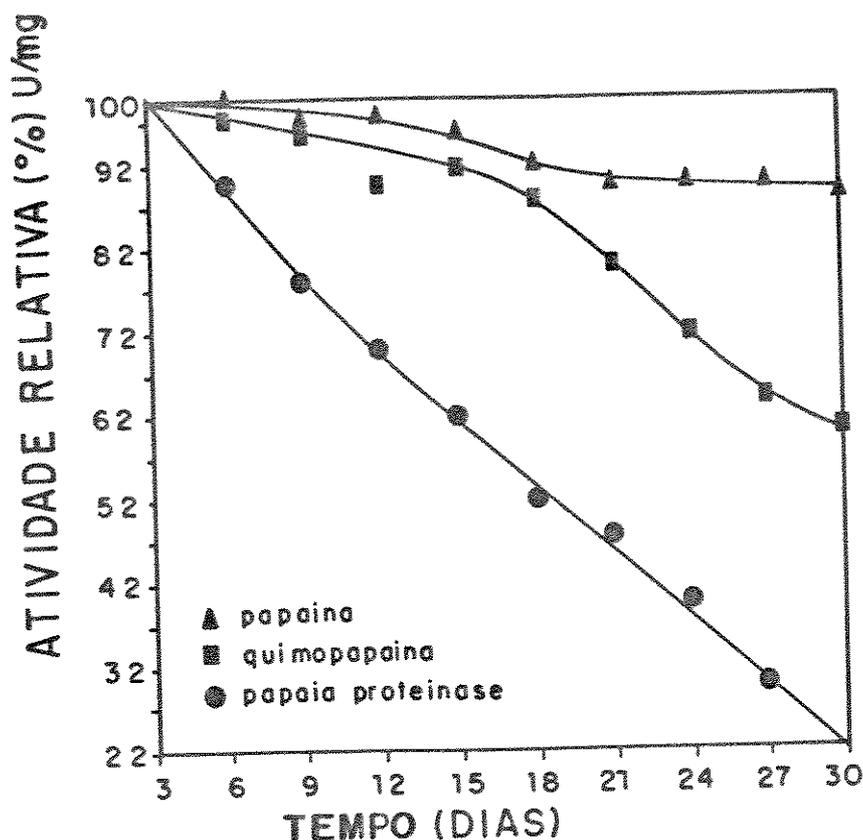


FIGURA 26. Estabilidade das proteases em função do tempo.

Condições: A mistura de reação estava contida num volume de 3ml: tampão fosfato de sódio 0,1M pH 7,0; solução de cisteína 5mM e EDTA 1mM; solução de enzima com concentração variando na faixa de $2 \cdot 10^{-6}$ a $5 \cdot 10^{-6}$ M. Esta mistura foi termostatizada a 37°C , em seguida adicionou-se 1ml de caseína N,N'-dimetilada a 1% durante 30 minutos. A reação, foi interrompida com a adição de 3ml de ácido tricloroacético 5%. A leitura de absorbância foi efetuada a 280nm. As enzimas eram estocadas a 4°C .

VII.12. VARIAÇÃO DA ENTALPIA DE DESNATURAÇÃO ΔH_{DESN}

A Figura 27 mostra os termogramas obtidos no DSC para a desnaturação das enzimas proteolíticas do látex. As enzimas quimopapaína B e papaia proteinase mostraram um perfil do termograma (DSC) obedecendo uma cinética de desnaturação em dois estados (nativo e desnaturado). Entretanto, a papaina mostra a existência de estados intermediários.

A temperatura de desnaturação da quimopapaína B e papaia proteinase são muito próximas (quimopapaína B e papaia proteinase $90^{\circ} \pm 2^{\circ}\text{C}$). A Figura 28 mostra o perfil do termograma (DSC) em pH 3,0, no qual ocorrem algumas modificações para a quimopapaína B e papaia proteinase. A temperatura de desnaturação diminui cerca de 30°C e o ΔH_{DESN} diminui significativamente para as três enzimas estudadas (Tabela VII). A papaina mostrou duas temperaturas de desnaturação uma a 70° e outra a 94°C .

Para realizar o estudo térmico da desnaturação das proteases imobilizadas foi primeiramente efetuado o DSC do suporte (sílica gel silanizada), na faixa de temperatura de 40° a 120°C (Figura 29). Como a sílica silanizada não apresentou transição significativa, o estudo térmico da desnaturação das proteases do látex imobilizadas foi feito, mantendo-se na panela de referência a solução tampão. Na Figura 30, pode-se observar que a imobilização não apresentou uma mudança significativa quanto à temperatura de desnaturação.

Na tabela VII estão resumidos os valores dos parâmetros termodinâmicos da desnaturação.

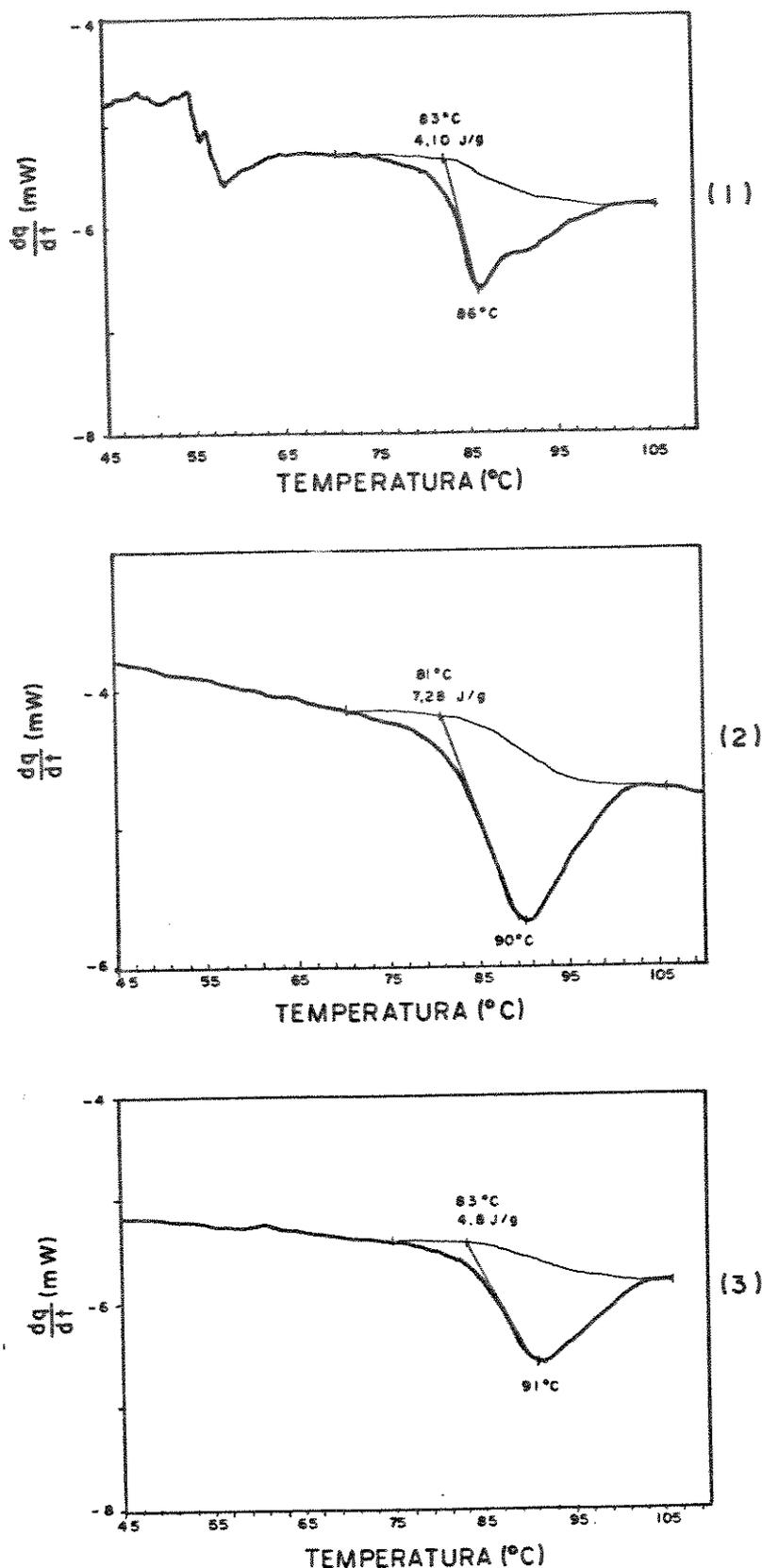


FIGURA 27. Curvas de DSC das proteases do látex em pH 7,0.

Condições: As enzimas papaína (380 mg/ml), quimopapaína (346mg/ml), papaya proteinase (377 mg/ml). Diluídas em tampão fosfato de sódio 0,1M pH 7,0 foram colocadas em uma panela de alumínio e fechadas hermeticamente. A velocidade foi de 5 $^{\circ}\text{C}$ por minuto e a variação de temperatura foi de 45 $^{\circ}\text{C}$ até 110 $^{\circ}\text{C}$.

1. papaína; 2. quimopapaína; 3. papaya proteinase

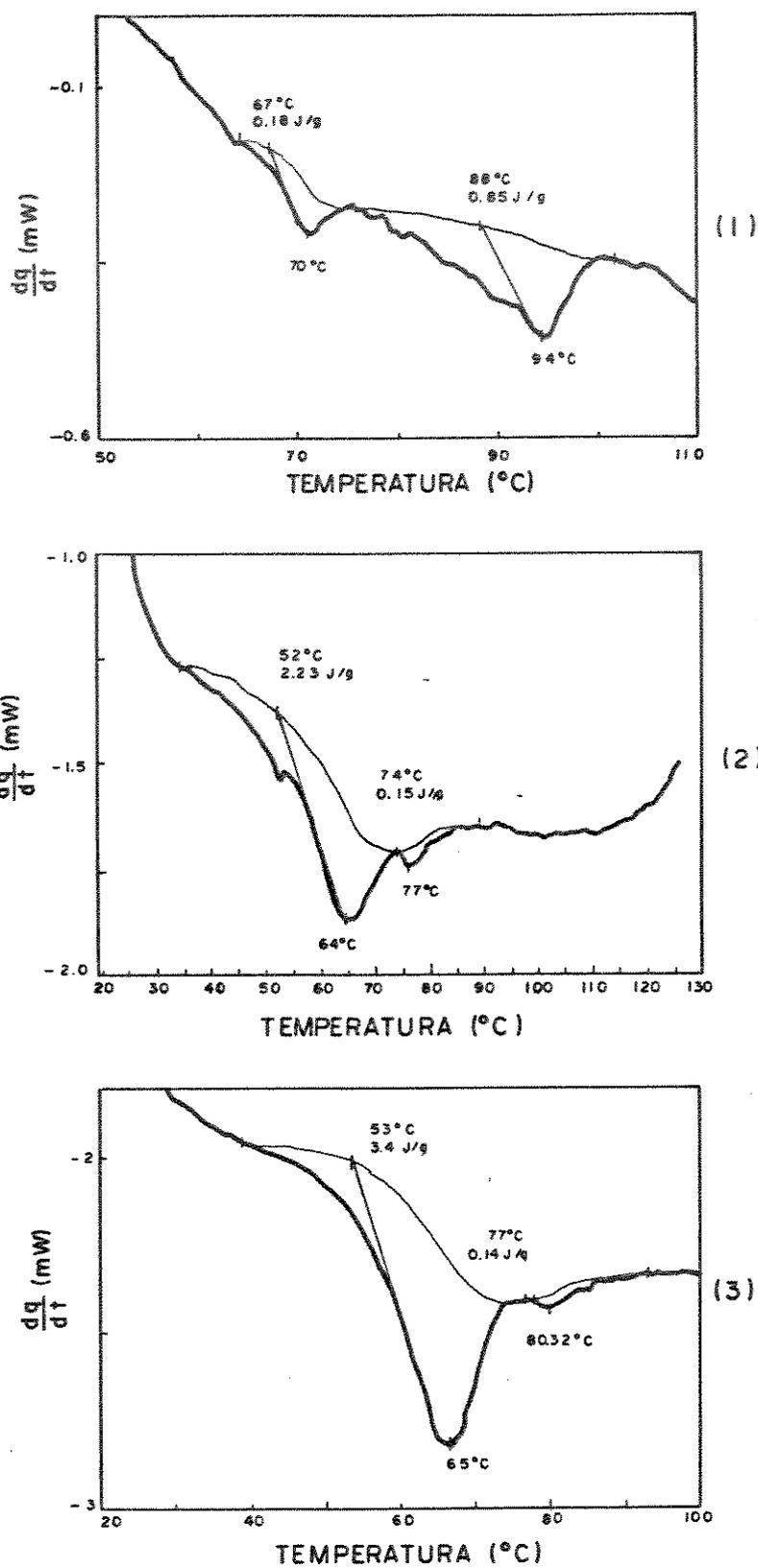


FIGURA 28. Curvas de DSC das proteases em pH 3,0.
 Condições: Conforme descrito na Figura 28.
 1. papaína; 2. quimopapaína; 3. papaya proteinase

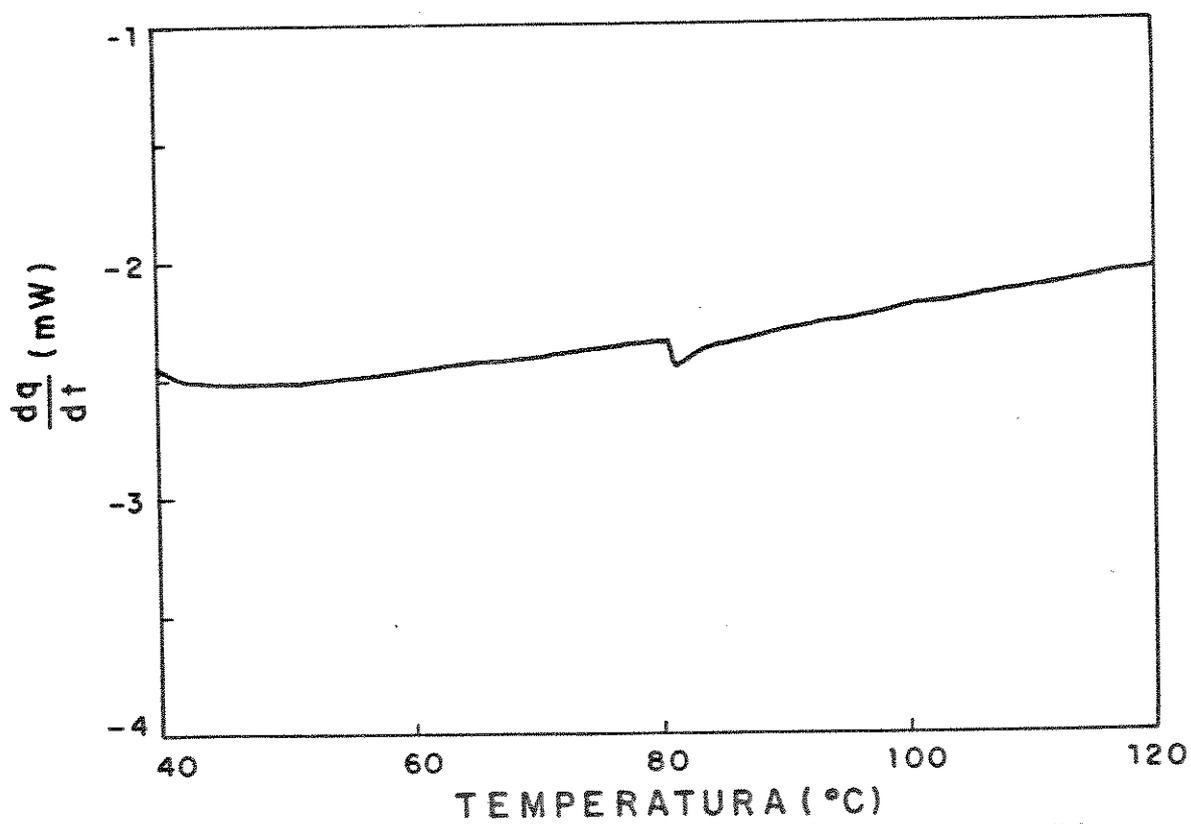


FIGURA 29. Curvas de DSC da sílica gel.
Condições: 22,4mg de sílica gel foram colocada em um panela de alumínio. As demais condições são iguais as descritas na Figura 28.

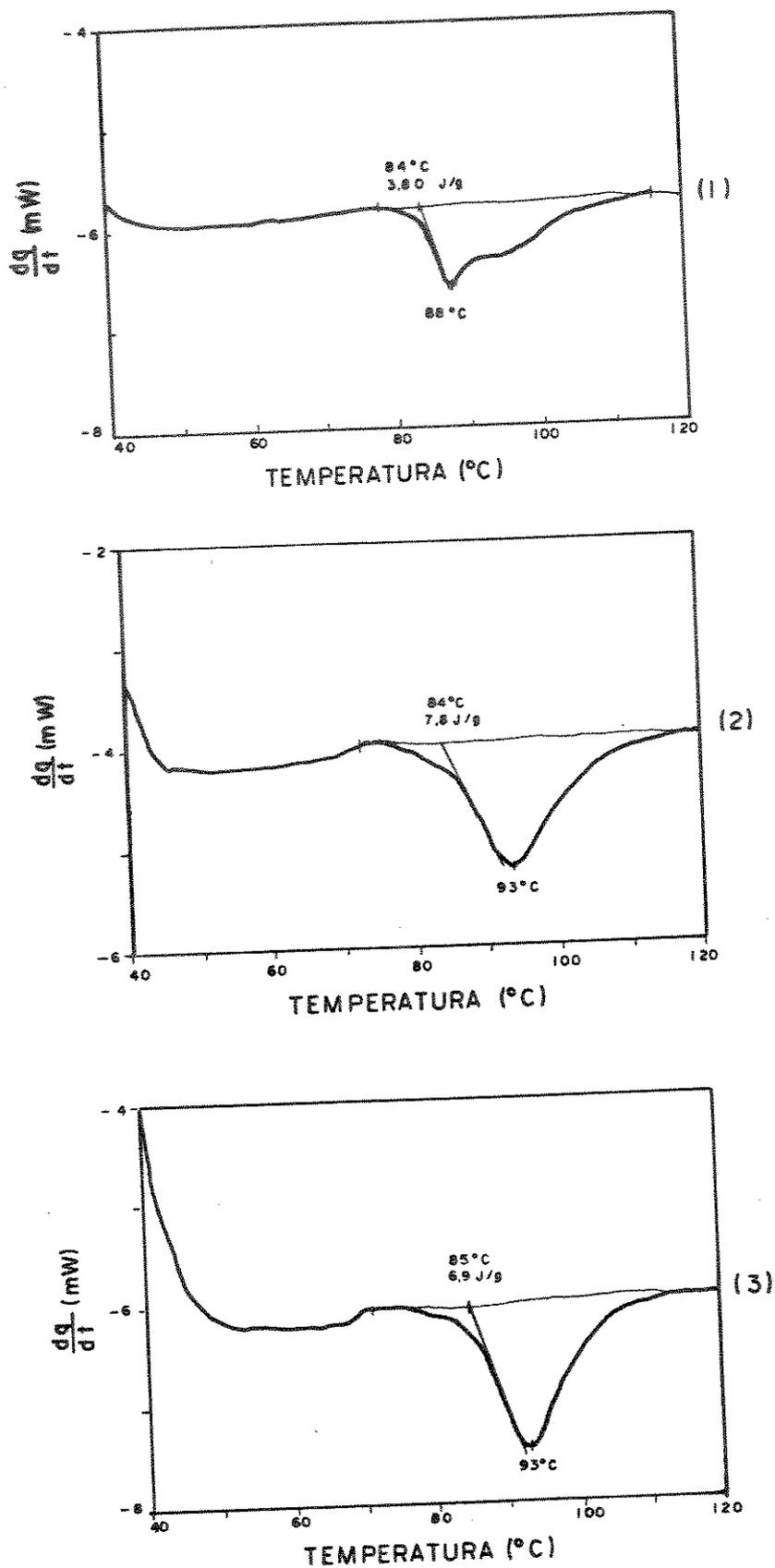


FIGURA 30. Curvas de DSC das enzimas imobilizadas em pH 7,0. Condições: As enzimas imobilizadas foram pesadas e colocadas na panela de alumínio. As demais condições são iguais às descritas na Figura 28.
1. papaína; 2. quimopapaína; 3. papaya proteinase

TABELA VII. PARÂMETROS TERMODINÂMICOS DE DESNATURAÇÃO DAS PROTEASES.

Enzimas	Tampão	$T_{\text{máx}}$ ($^{\circ}\text{C}$) $\pm 1^{\circ}\text{C}$	ΔH_{DESN} ($\text{kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$)
Papaína (a)	pH 7,0	86	247,0
	pH 3,0	70 e 94	11,0
Papaína (b)	pH 7,0	88	258,0
Quimopapaína (a)	pH 7,0	90	735,2
	pH 3,0	64	15,3
Quimopapaína (b)	pH 7,0	93	782,5
Papaya proteinase (a)	pH 7,0	91	500,1
	pH 3,0	65	12,4
Papaya proteinase (b)	pH 7,0	93	512,5

(a) Enzimas em solução (b) Enzimas imobilizadas

Condições: As condições são iguais às descritas nas Figuras 27, 28 e 30.

VII.13. CÁLCULOS DA RELAÇÃO DE $\Delta H_{\text{VAN'T HOFF}}/\Delta H_{\text{DESN}}$

O cálculo da relação de $\Delta H_{\text{van't Hoff}}/\Delta H_{\text{DESN}}$ para as enzimas proteolíticas livres e imobilizadas está contido na Tabela VIII.

A papaína apresentou um valor de 1,92 quimopapaína B e papaya proteinase 0,61 e 1,03 respectivamente. Quando as enzimas foram imobilizadas encontramos os seguintes valores: papaína 1,54, quimopapaína B 0,40 e papaya proteinase 0,78

Após a imobilização as enzimas continuam apresentando a mesma tendência para a relação: papaína > 1 ; quimopapaína B e papaya proteinase < 1 .

Em pH 3,0 as enzimas livres apresentam um aumento drástico desta relação. Para papaína, na primeira temperatura de desnaturação a relação foi 23,5 e na segunda 26 para quimopapaína B foi de 36,8 e para a papaya proteinase 27,5. A Figura 31 mostra a equação de van't Hoff aplicada as proteases livres e em pH 7,0.

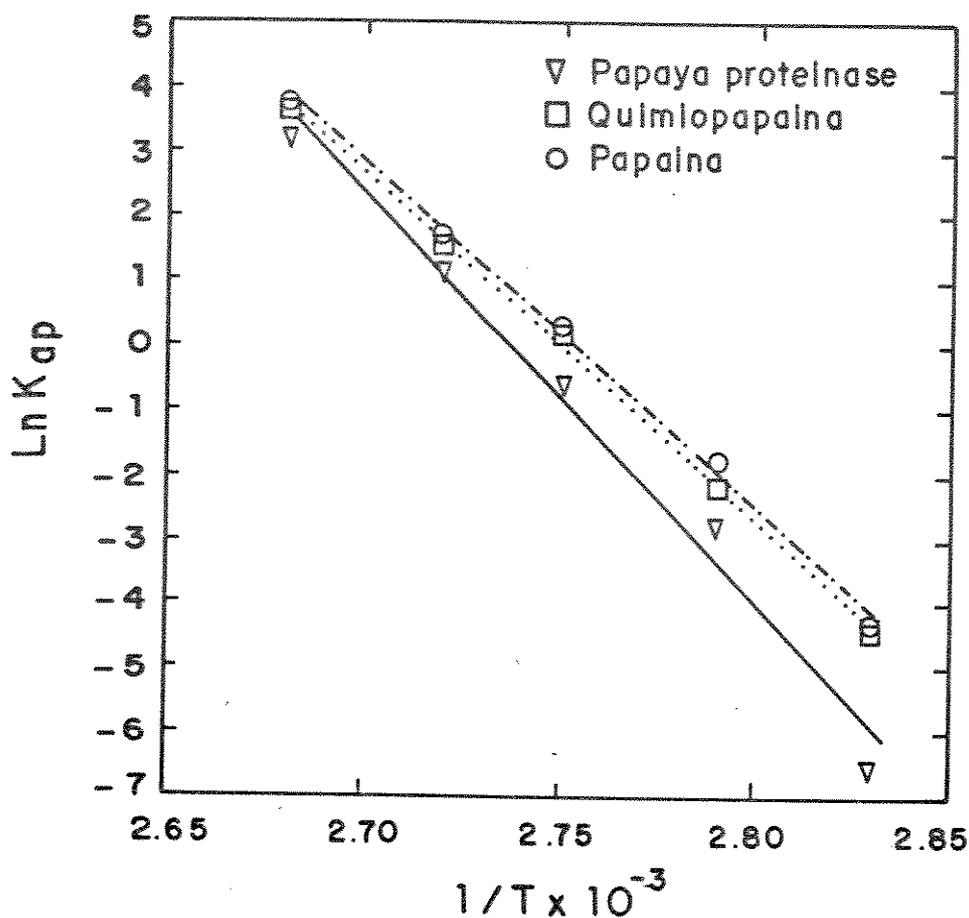


FIGURA 31. $\ln K_{app}$ em função do inverso da temperatura.

Condições: O cálculo da constante K_{app} foi realizado através da técnica da pesagem do termograma DSC obtido para as três proteases estudadas em tampão fosfato de sódio 0,1 M pH 7,0.

TABELA VIII. CÁLCULOS DA RELAÇÃO $\Delta H_{van'T Hoff} / \Delta H_{DES N}$ PARA AS ENZIMAS PAPAÍNA, QUIMOPAPAÍNA B E PAPAYA PROTEÍNASE.

CONDIÇÕES	ENZIMAS	$\Delta H_{van'T Hoff} / \Delta H_{DES N}$
Desnaturação das enzimas em solução em pH 7,0	Papaína	1,92
	Quimopapaína B	0,61
	Papaya Proteinase	1,03
Desnaturação das enzimas imobilizadas em pH 7,0	Papaína	1,54
	Quimopapaína B	0,40
	Papaya Proteinase	0,78
Desnaturação das enzimas em soluções em pH 3,0	Papaína	23,5 e 26,0
	Quimopapaína B	36,5
	Papaya Proteinase	27,3

Condições: $\Delta H_{van'T Hoff}$ foi calculado através do coeficiente angular das retas da Figura 31.

VII.14. ATIVIDADES DAS ENZIMAS PROTEOLÍTICAS EM FUNÇÃO DA TEMPERATURA

Antes do estudo calorimétrico da proteólise foi necessário conhecer a atividade destas enzimas purificadas em solução tampão, a 37°C como já descrito na parte experimental. Na Figura 32 estão os resultados da atividade específica das três proteases do látex com o tempo. Pode-se observar que as enzimas mantiveram 100% de atividade após a incubação a 37°C em tampão fosfato de sódio pH 7,0.

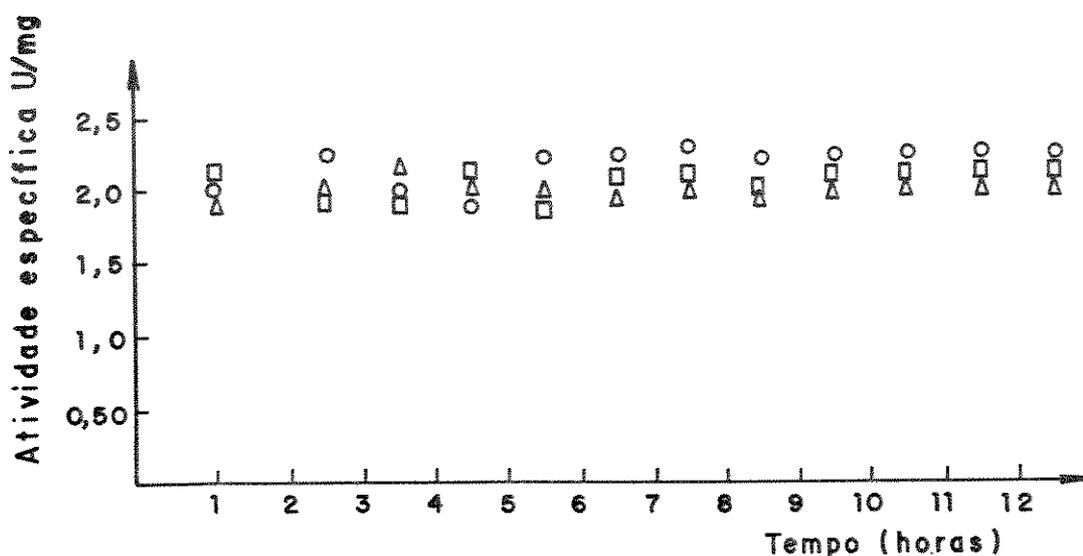


FIGURA 32. Atividades das enzimas proteolíticas a 37°C em função do tempo. Condições: Colocou-se a enzima em concentração adequada para incubar a 37°C com tampão fosfato de sódio pH 7,0 0,1M; uma solução de cisteína 5mM e EDTA 1mM. Em intervalos de uma em uma hora tirava-se uma alíquota e colocava-se para reagir com caseína N,N'-dimetilada a 1%. Após trinta minutos interrompia-se a reação com a adição de TCA 5%, filtrava-se a suspensão obtida e realizava-se leituras de absorvâncias em 280 nm.
(○) papaína; (□) quimopapaína; (△) papaia proteinase.

VII.15. VARIAÇÃO DA ENTALPIA DE PROTEÓLISE ΔH_{PROT}

Na Figura 33 está representado o perfil do termograma das três enzimas, após a adição de 16 μl de solução de substrato. A reação proteolítica é exotérmica e a quimopapaína B e papaína apresentam ΔH_{PROT} próximos, entretanto, a papaia-proteinase apresenta ΔH_{PROT} cerca de quatro vezes maior que o da papaína e três vezes maior do que o da quimopapaína. Os valores de ΔH_{PROT} obtidos estão resumidos na Tabela IX e foram calculados através da relação $Q = \Delta H \cdot n$ utilizando valores de Q e n mostrados na Figura 34.

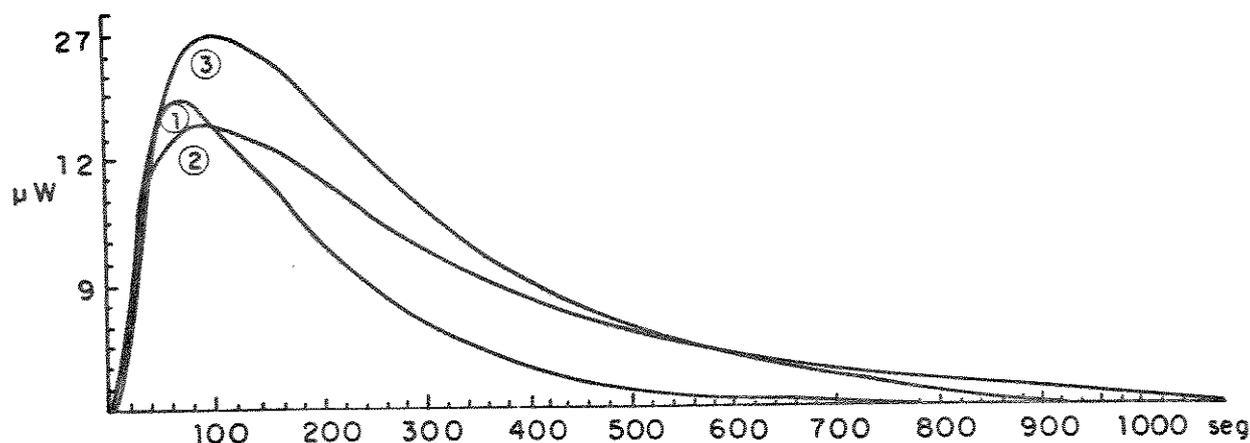


FIGURA 33. Termograma da titulação microcalorimétrica das proteases.

Condições: Uma solução contendo: 18mg/ml de papaína; 20mg/ml de quimopapaína e 24mg/ml de papaya proteinase; em tampão fosfato de sódio 0,1M pH 7,0; cisteína 5mM e EDTA 1mM. Foram colocadas no microcalorímetro para estabilizar a 37°C. Após doze horas quando obtinha-se uma linha base estável adicionou-se 16 μ l de caseína N,N'-dimetilada a 1%, com o auxílio de uma seringa de insulina que tinha acoplada a ela um fio de aço inoxidável medindo 1,0m por 16mm. O registro do termograma era feito com o auxílio de um registrador acoplado ao microcalorímetro, a velocidade era de 0,5mm/seg e o fundo de escala era de 1000mv. Para as enzimas quimopapaína e papaya proteinase realizou-se o mesmo procedimento sendo que as enzimas foram colocadas nas seguintes concentrações: quimopapaína B 20mg/ml e papaya proteinase 24mg/ml.

1. papaína; 2. quimopapaína; 3. papaya proteinase

TABELA IX. VARIAÇÃO DA ENTALPIA DE PROTEÓLISE.

Enzimas	$\Delta H_{\text{PROT}}/\text{mol de Caseína N,N'-dimetilada}$
Papaína	-528,5 kJ
Quimopapaína	-790,5 kJ
Papaya Proteinase	-2.059,0 kJ

Condições: O valor de ΔH de proteólise foi calculado através da Figura 34, utilizando-se a relação $Q = \Delta H \cdot n$.

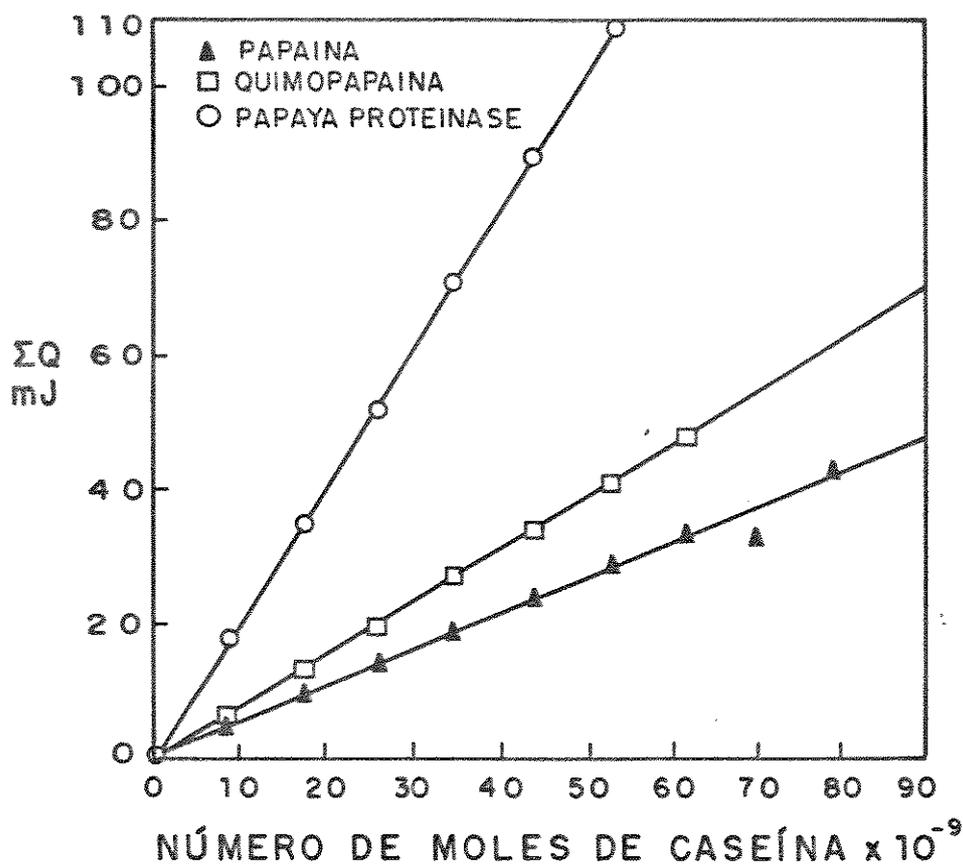


FIGURA 34. Titulação microcalorimétrica das proteases.

Condições: Cada ponto experimental representa um termograma como descrito na Figura 33.

VII.16. ELETROFORESE EM GEL DE POLIACRILAMIDA EM SISTEMA DESNATURANTE DOS PEPTÍDEOS OBTIDOS APÓS A PROTEÓLISE

O perfil eletroforético dos peptídeos obtidos após a proteólise está apresentado na Figura 35. As proteases papaina e quimopapaina apresentaram um perfil muito semelhante, entretanto, a papaya proteinase apresentou um perfil diferente isto é, contendo um maior número de peptídeos.

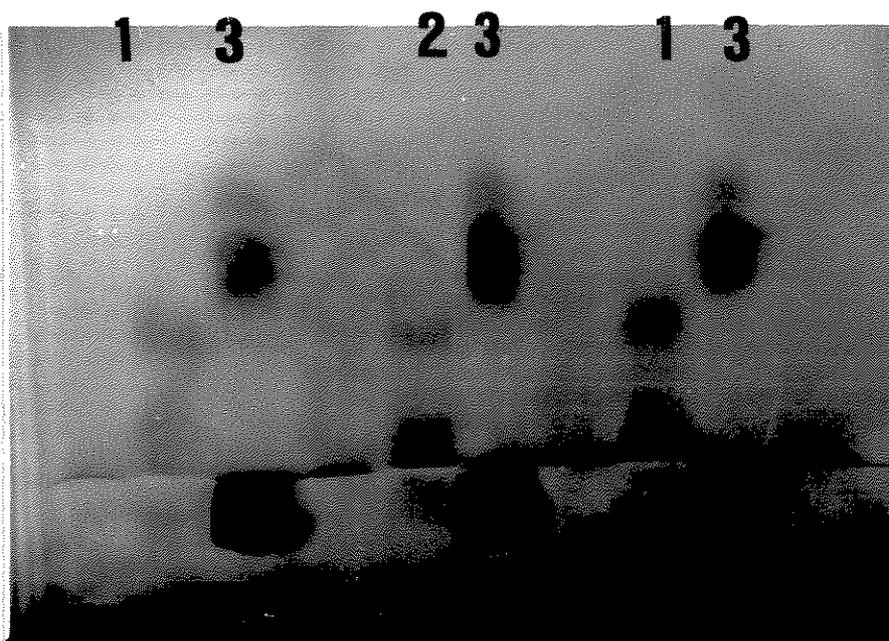


FIGURA 35. Eletroforese em gel de poliacrilamida em SDS do material de próteólise obtido após adição de TCA a 5% e filtrado.

Condições: Concentração do gel 12%; tampão tris glicina pH 8,8; corrente elétrica 30mA; temperatura ambiente; indicador de corrida azul de bromofenol; duração 7 horas; coloração com prata.

poço 1= produto de hidrólise do substrato caseína N,N'-dimetilada pela enzima papaína

poço 2= produto de hidrólise do substrato caseína N,N'-dimetilada pela enzima quimopapaína B

poço 3= produto de hidrólise do substrato caseína N,N'-dimetilada pela enzima papaya proteinase

VIII. DISCUSSÃO

VIII.1. PURIFICAÇÃO DA QUIMOPAPAÍNA B E PAPAYA PROTEINASE

A separação das enzimas do látex, quimopapaína B e papaya proteinase, utilizando coluna de CM-Celulose mostrou a possibilidade de separação quase completa dos componentes proteicos entre si, em uma única etapa, utilizando-se como eluente o tampão acetato de sódio pH 5,0 com concentrações crescentes. O resultado eletroforético em gel de poliacrilamida a 15% em pH 4,5, em sistema não desnaturante, confirma que a quimopapaína B e a papaya proteinase apresentam um único componente proteico.

Estes resultados estão de acordo com os obtidos por JORGE (127) e BASILIO (126). Entretanto, os mesmos autores não conseguiram picos tão nitidamente separados quanto os que nós obtivemos e não separaram a lisozima da quimopapaína A. Com a introdução de mais uma etapa de eluição proposta por BASILIO et alii (130) com tampão 0,5 M foi possível obter a quimopapaína A livre de lisozima, e também uma nítida separação das quimopapaínas A e B como mostra o perfil cromatográfico da figura 11..

O método proposto por KUNIMITSU e YASUNOBU (22) para purificação das quimopapaínas é considerado como padrão para purificação destas proteases. Este método envolve o uso de resinas catiônicas e apresenta a desvantagem de submeter o látex a tratamentos com soluções fortemente ácidas, fracionamento com sais e um grande volume de eluato, não proporcionando uma boa separação das quimopapaínas. Na literatura encontramos alguns autores que modificaram este método. Entretanto, esses submetem o látex a fracionamento com sulfato de amônio, após cromatografia em resina de troca iônica apresentando a desvantagem de usar um grande volume de eluato.

Quando comparamos os valores da tabela de purificação destes autores com aqueles aqui apresentados (Tabela III), observamos que os valores finais de rendimento e atividade específica obtidos neste trabalho estão muito próximos, levando a conclusão de que as etapas de tratamento com soluções ácidas e fracionamento por sais podem ser eliminados sem causar prejuízos para a purificação.

A papaya proteinase, a mais básica das proteases do látex foi descrita pela primeira vez por SHACK (31). E tem sido descrita na literatura de modo controverso por alguns autores como sendo constituída por mais de um componente proteico. Contudo, nesta tese, quando eluída com tampão acetato de

sódio 1,0 M pH 5,0 a papaya proteinase, apresentou um intenso pico simétrico (Figura 11), indicando que esta proteína é composta por um único componente proteico, fato este também confirmado por eletroforese em gel de poliacrilamida (Figura 9).

VIII.2. PURIFICAÇÃO DA PAPAÍNA

O método descrito neste trabalho para a preparação da papaína foi realizado por modificações no método de BROCKLEHURST e BAINES (17). O que nos permitiu trabalhar com um menor volume de solução durante o fracionamento, além de não submeter o látex a tratamento com agente oxidante. Obtivemos um rendimento cerca de 2,5% maior da enzima na forma cristalina.

Contrariamente ao descrito por JORGE (127) e MONTI (19) constatou-se que é possível cristalizar a papaína a 4°C quando esta é procedente do látex seco, apresentando um alto grau de estabilidade. A suspensão de cristais desta enzima em solução de NaCl foi mantida a 4°C durante um mês, com perda de 22% de atividade.

Apesar do método de preparação da papaína ser simples, a enzima foi obtida com alto grau de pureza, comparável ou superior a métodos mais sofisticados tais como de KIMMEL e SMITH (18) e o de coluna de afinidade descrito por MÉNARD et alii (8).

Os valores de purificação obtidos encontram-se na Tabela IV e estão de acordo com os valores encontrados por JORGE (127) para papaína purificada, a partir do látex de mamoeiro fresco.

VIII.3. CARACTERIZAÇÃO CINÉTICA DAS PROTEASES DO LÁTEX DO MAMOEIRO

VIII.3.1. Reação Proteolítica

Observamos que a papaína e quimopapaína B apresentam valores próximos de K_M em relação ao substrato tipo Hammrsten. Uma possível explicação para estes resultados pode ser o fato da papaína conter, na sua estrutura, sete subsítios ativos sendo cada um destes capaz de acomodar e clivar diferentes ligações peptídicas. A existência destes subsítios é mostrada nos trabalhos de DRENTH et alii (131) através de estudos cinéticos e dados cristalográficos. Para a caseína N,N'-dimetilada a quimopapaína apresentou um K_M cerca de

duas vezes menor do que a papaína. Acreditamos que esta diferença dos valores de K_M deva-se à modificações estruturais da caseína devido à metilação.

Os resultados obtidos para papaya proteinase demonstram que esta enzima possui em relação aos substratos um K_M muito maior do que as outras proteases, indicando ser menor a afinidade desta enzima por estes substratos testados. Estudos realizados por BUTTLE et alii (132), provam que o sítio ativo da papaya proteinase é constituído pelos aminoácidos ácido glutâmico e arginina, nas posições 23 e 65 respectivamente (subsítio S1). Estes dois aminoácidos estão localizados na parede da fenda do sítio ativo perto da cisteína-25 e estes dois resíduos formam uma barreira através da parte superior da fenda. Esta barreira glutamato/arginina é rígida, devido ao empacotamento hidrofóbico entre grupos metila, pontes de hidrogênio e interações hidrofóbicas existentes entre os grupos amino e as respectivas cadeias laterais, impedindo a aproximação de resíduos do substrato com cadeias laterais longas. Os dados cinéticos obtidos neste trabalho confirmam a baixa afinidade desta enzima em comparação com a papaína e a quimopapaína B por substratos proteicos. Esta restrição estérica imposta pela citada barreira pode ser observada nos resultados da tabela VI.

VIII.3.2. Reação Esterolítica

Observou-se que o valor de K_M para o substrato sintético BAEE em relação as enzimas papaína e quimopapaína B é aproximadamente mil vezes maior do que para o Z-ala-pNP, indicando que este último substrato possui uma afinidade muito maior. Estes resultados são concordantes com alguns resultados citados na literatura, entre os quais podemos citar os de JORGE (127), MONTI (19), SANNER e PHIL (133). Entretanto, estes autores acreditam que existe, associadas às moléculas de proteínas do látex, substâncias de pequeno peso molecular capazes de inibir a ação catalítica destas enzimas. JORGE (127) mostrou que a diálise inicial do látex contra água destilada é essencial para eliminação destas moléculas. Neste trabalho foi utilizada a diálise inicial, com a preocupação de eliminar os supostos inibidores das proteases do látex. Os valores de K_M obtidos para as enzimas, são próximos aos encontrados por JORGE (127) e MONTI (19), mas menores do que os valores encontrados em outros trabalhos (BUTLE e BARRET (27) e JACQUET et alii (50)), LEE e KIM (129) sugeriram que outros fatores alheios ao resíduo de cisteína-25 que constituem o sítio ativo grupo das proteases do látex devem influenciar na atividade destas enzimas.

Na literatura, existe uma considerável controvérsia a respeito dos valores de K_M e K_{cat} para estas enzimas sobre diferentes substratos sintéticos. Acreditamos que essas diferenças podem ser explicadas pela possibilidade de que diferentes preparações de enzima possam conter diferentes quantidades de inibidores em função das modificações nos procedimentos de preparação.

VIII.3.3. Cinética Enzimática das Enzimas Imobilizadas

Quando uma enzima é imobilizada se observa geralmente um aumento na constante de Michaelis-Menten. Este aumento é devido a carga do suporte, efeito de difusão e mudança na conformação terciária (134).

No estudo cinético das enzimas imobilizadas, observou-se esta mesma tendência de aumento do K_M . Ressaltamos, entretanto, que a papaína apresentou um menor K_M , ou seja, uma maior afinidade pelo substrato como se pode observar pelas Figuras 22, 23 e 24 as enzimas imobilizadas não apresentaram um desvio do comportamento michaeliano (135).

Não há na literatura citação das enzimas quimopapaína B e papaya proteinase imobilizadas pelo método descrito neste trabalho. Entretanto verificou-se que o pH ótimo das proteases imobilizadas são concordantes com os das enzimas livres, obtidos por EBATA e YASUNOBU (22).

Para a papaína imobilizada, os nossos resultados com relação ao pH ótimo são concordantes com os obtidos por WEETALL e MANSON (136) os quais concluíram que atividade máxima da papaína imobilizada também sobre vidro ocorre a pH 7,0.

VIII.4. ESTABILIDADE DAS PROTEASES DO LÁTEX DO MAMOEIRO

Na Tabela X, estão apresentados os dados da papaína cristalina imobilizada com diferentes suportes por WEETALL e MANSON(136). Observa-se que o tempo de vida médio ($T_{1/2}$) variou de 2,2 dias no mínimo, até um máximo de 35 dias. Uma análise da Figura 26 mostra que a papaína cristalina em solução, preparada em nosso laboratório perdeu 22% de sua atividade em 30 dias. O que nos leva concluir que nosso método de preparação da papaína em solução permite, maior estabilização do que algumas metodologias de imobilização apresentadas na literatura entre elas destacamos: WEETALL e MANSON (136); WEETALL (137) e MAKSIMENKO et alii (138).

TABELA X. PAPAÍNA LIGADA AOS SUPORTES POR DIFERENTES MÉTODOS (136).

Suportes	Método de Ligação	Atividade Original	Atividade Final	T _{1/2} (dias)
CP6-COOH	amida	38,5	1,43	4,1
CP6-NH ₂	glutaraldeído	41,1	1,67	2,2
CP6-NH ₂	carbodiimida	85,1	0,23	1,9
CP6-arilamina	azo	32,9	0,32	7,2
ZrO ₂ -arilamina	azo	32,9	0,24	6,7
ZrO ₂ -COOH	amida	15,3	6,35	35,0

WEETALL (137) desenvolveu alguns métodos de imobilização da papaína cristalina e do extrato do látex bruto sendo que os valores obtidos estão resumidos na Tabela XI. A estabilidade média foi de 60 dias, mostrando que a papaína cristalina tem maior atividade do que o extrato do látex bruto, sugerindo que é melhor purificar cada uma das proteases antes de se imobilizar.

O método empregado neste trabalho foi o de imobilização por ligação cruzada, utilizando-se o glutaraldeído como ligante. Esta técnica mostrou ser excelente por vários motivos:

- possibilitou a imobilização das três enzimas, apesar destas serem sulfidrilas-dependentes sendo que nenhuma delas foi inativadas e nem seus comportamentos cinéticos sofreram desvio do comportamento michaeliano;
- promoveu a manutenção das enzimas num ambiente semelhante ao encontrado na natureza, conferindo-lhe boa estabilidade, o que foi confirmado pelos resultados apresentados na Figura 25 (após oito meses de imobilização as enzimas mantêm sua estabilidade);
- o método é barato e extremamente simples de ser executado, o que o torna muito atrativo para a indústria de fármacos, cosméticos e de alimentos;
- a enzima papaína reteve 70% da sua atividade em relação a seu estado nativo, resultados estes de acordo com alguns dados da literatura entre os quais destacamos os de KULYS (139) e os de GUILBAULT (140); a quimopapaina reteve 40% e a papaya proteinase 50% (BASÍLIO et alii (141)).

TABELA XI. RESUMO DOS PARÂMETROS DA ESTABILIDADE DA PAPAÍNA IMOBILIZADA (137).

Suportes	Condições de Estocagem	Atividade Original (mg/g)	Tempo de Estocagem (dias)	Atividade Final*	Porcentagem Original da Atividade Retida
CGW-AP ₁	5°	3,85	60	0	0
CGW-AP ₂	23°	3,85	60	0	0
CGW-AP ₈	5°	31,40	41	31,4	100
CGW-AP ₉	5°	0,16	42	0,16	100
CGW-SP ₁	5°	1,49	60	0	0
CGW-SP ₁	23°	1,49	60	0	0
CGW-SP ₂	5°	1,84	60	0	0
CGW-SP ₂	23°	1,84	60	0	0
CGW-SP ₄	5°	0,07	44	0,07	100
Cell P	5°	0,66	58	0,045	68
Cell P	23°	0,66	58	0,035	54
MP	5°	1,20	10	1,20	100

* Atividade expressa como mg de proteína por grama do suporte. Atividade da enzima imobilizada foi determinada, assumindo que a solução de enzima livre tem a mesma atividade.

GGW-AP₂ – látex total ligado covalentemente a poros de vidro por azo ligação

CGW-AP₈ – látex total ligado covalentemente a poros de vidro por azo ligação

CGW-AP₉ – Papaína cristalina ligada covalentemente a poros de vidro por azo ligação

CGW-SP₁ – Látex total ligado covalentemente a poros de vidro por ligação sulfonamida

CGW-SP₄ – Papaína cristalina ligada covalentemente a poros de vidro por ligação sulfonamida

Cell P – Papaína cristalina ligada covalentemente a celulose pelo método azida

MP – Papaína cristalina ligada covalentemente a poliamino ácido por ligação azo

VIII.5. VARIAÇÃO DA ENTALPIA DE DESNATURAÇÃO DAS CISTEÍNAS PROTEASES

Os aspectos mais notáveis da estabilidade conformacional da proteína do estado nativo estão associados com a alta organização da água ao redor dos sítios hidrofóbicos no estado desnaturado. Mais especificamente, há uma capacidade calorífica muito grande associada com a proteína desenrolada, a qual aparentemente reflete uma surpreendente alteração no processo de acomodação dos sítios hidrofóbicos

expostos ao solvente com o aumento de temperatura. Os experimentos realizados com DSC convencional não fornecem um valor confiável de ΔC_p para comparação das três enzimas estudadas.

Os dados termodinâmicos de desnaturação obtidos por DSC foram comparados com um modelo simples de desnaturação em dois estados (nativo e desnaturado).

Observando os termogramas de DSC para as enzimas quimopapaína B e papaya proteinase (Figura 27), verifica-se que não há indicação de etapas intermediárias.

A temperatura média de desnaturação destas duas enzimas é muito alta, em torno de 90°C, e conseqüentemente apresentam valores ainda maiores para a variação de entalpia de desnaturação.

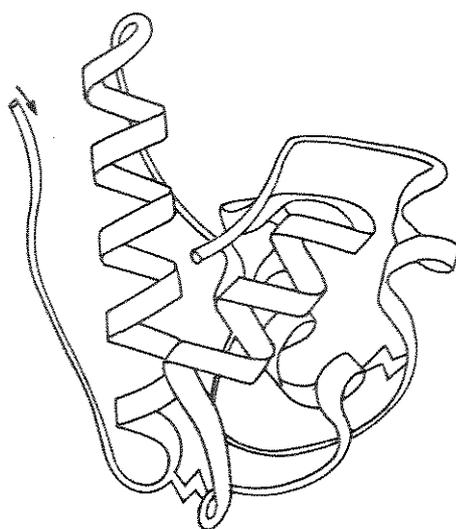
Na Tabela XII estão representados os números de aminoácidos hidrofóbicos e hidrofílicos das três proteases estudadas. Embora a quimopapaína B e papaya proteinase apresentem um maior número de resíduos hidrofóbicos (responsáveis pelo enovelamento) em comparação com a papaína, acreditamos que este fato contribua para a grande diferença entre o ΔH_{DESN} destas enzimas comparadas com a papaína. Entretanto, acreditamos que a maior contribuição se deva à distribuição destes resíduos hidrofóbicos ao longo da estrutura primária destas enzimas.

TABELA XII. COMPARAÇÃO DA SEQUÊNCIA DE AMINOÁCIDOS QUE COMPÕE: PAPAÍNA, QUIMOPAPAÍNA E PAPAYA PROTEINASE (142).

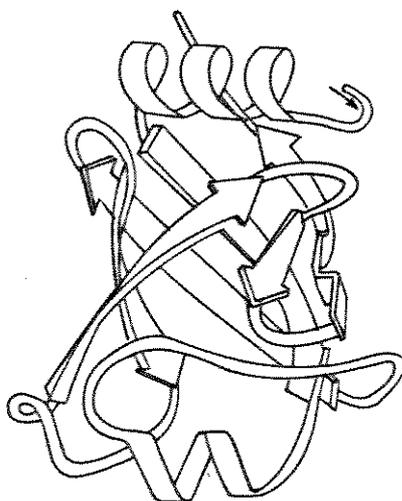
Enzimas	No. de Aminoácidos Total	No. de Aminoácidos Hidrofóbicos	No. de Aminoácidos Hidrofílicos	No. de Aminoácidos com Grupo R Carregado
Papaína	213	64	82	67
Quimopapaína B	218	73	91	54
Papaya Proteinase	216	76	85	55

De acordo com PRIVALOV (143) o processo de desnaturação é cooperativo, isto é, considerando a estrutura terciária da proteína como constituída por blocos de aminoácidos, quando a energia térmica for suficiente para desestruturar o primeiro bloco, os blocos restantes serão progressivamente desestruturados requerendo menor energia em cada etapa.

A papaína apresenta um termograma de estabilidade térmica, que indica a possível existência de etapas intermediárias entre o estado nativo e desnaturado Figura 27. Esta observação está de acordo com a sua estrutura, pois a molécula possui dois domínios estruturais bem definidos, como que separados por uma fenda, determinados por estudo de cristalografia de raio X (144). Na Figura 36 temos representados os domínios 1 e 2 dessa protease cuja conformação faz com que os domínios representem sistemas cooperativos quase independentes entre si (145).



DOMÍNIO 1



DOMÍNIO 2

FIGURA 36. Domínios da papaína (146).

Os domínios, bem como as subunidades, podem servir como moduladores que auxiliam no eficiente conjunto de construção da conformação nativa da proteína. Indubitavelmente, a existência de dois domínios separados é importante para simplificar o processo de enrolamento e desenrolamento das proteínas e para separar em etapas, especialmente no caso das proteínas grandes.

De acordo com RICHARDS (147) existem três possíveis mecanismos para o processo de desenrolamento das proteínas. No mecanismo I, a estrutura espacial não se submete a qualquer estado intermediário, este é o verdadeiro processo de uma cinética de primeira ordem em dois estados, as enzimas quimopapaína B e papaya proteinase obedecem a este mecanismo de desnaturação. No mecanismo II, a proteína é vista passando, gradualmente, de um estado inicial para estados intermediários até chegar ao final desnaturado. A papaína obedece a este mecanismo de desnaturação conforme pode-se observar pelo termograma da enzima, mostrado na Figura 27, o qual apresenta uma combinação de transições. No mecanismo III, a enzima armazena energia térmica e se desnatura bruscamente.

SZÖGYR e CSERHÁTI (148) estudaram a temperatura de transição da papaína utilizando um DSC convencional e demonstraram que a mesma apresenta duas temperaturas de transição. Por outro lado, dados recentes de estudos calorimétricos juntamente com estudos de deconvolução têm demonstrado que várias proteínas apresentam muitas temperaturas de transição (MAKHATADZE e PRIVALOV (149), PRIVALOV e MAKHATADZE (150), MORIAN e FREIRE (151), BRANDTS et alii (152), BRANDTS et alii (89), BARONE et alii (153), SÁNCHEZ-RUIZ et alii (154), STURTEVANT et alii (155)).

A formação de domínios e o mecanismo de desnaturação passando por estados intermediários, requer uma menor quantidade de energia, tanto para o processo de desnaturação, quanto de enrolamento da proteína (156). Uma análise da tabela VII mostra que a papaína apresenta um ΔH_{DESN} menor do que as enzimas quimopapaína B e papaya proteinase. A papaína também apresenta uma temperatura de desnaturação menor do que as outras proteases. Os dados de ΔH_{DESN} confirmam os da literatura encontrados para a papaína, entretanto, as outras proteases não foram estudados e neste trabalho de tese foi demonstrado que é possível estudar a desnaturação térmica destas outras proteases.

Observou-se que em meio ácido (pH 3,0) ocorreu uma diminuição drástica da estabilidade térmica destas enzimas, o que pode ser observado pela grande diminuição do ΔH_{DESN} e da temperatura de desnaturação. Atribui-se a desestabilização das proteínas em meio ácido ao rompimento parcial da estrutura

terciária, decorrente do rompimento das ligações eletrostáticas entre grupos COO^- e NH_3^+ e pontes de hidrogênio, interações estas fortemente energéticas. Entretanto, acredita-se que as estruturas secundárias e primárias não são alteradas porque observou-se reversibilidade nos experimentos com DSC.

Na Figura 28 está representado o perfil do termograma da papaína em pH 3,0. Como pode-se observar, esta enzima mostrou duas temperaturas de desnaturação, sendo que o rompimento parcial da estrutura terciária devido ao meio ácido possibilitou a separação dos domínios 1 e 2, fazendo com que cada domínio apresentasse uma temperatura de desnaturação diferente.

O DSC utilizado neste trabalho é do tipo convencional enquanto que o recomendado para estudos de moléculas biológicas é o micro DSC de alta sensibilidade. Com base nos valores da temperatura de desnaturação, não se pode afirmar que o processo de imobilização protegeu as enzimas quanto à sua estabilidade térmica, uma vez que o desvio de $\pm 1^\circ\text{C}$ é limite de sensibilidade do DSC convencional. Entretanto, constatamos que houve um pequeno aumento no ΔH_{DESN} destas proteases imobilizadas.

Estudos de desnaturação térmica da papaína realizados por TIKTOPULO e PRIVALOV (157) sugerem que os dois domínios se desenrolam independentemente e podem ser tratados como dois polipeptídeos separados em termos das suas características de desnaturação (158). A separação distinta entre os dois domínios pode ser claramente vista na Figura 28.

PRIVALOV (159) mostrou, em estudos calorimétricos realizados com a papaína, que a razão $\Delta_{\text{DESN}}/\Delta H_{\text{van't Hoff}}$ é aproximadamente igual a 1,8, indicando que esta enzima não obedece a uma cinética em dois estados.

A relação $\Delta H_{\text{van't Hoff}}/\Delta H_{\text{DESN}}$ contida na Tabela VIII demonstrou que a papaína é constituída por dois domínios. Embora, tendo-se utilizado um DSC convencional os dados estão próximos dos obtidos por micro DSC por PRIVALOV (159). As outras proteases mostram pelos dados da Tabela VIII um processo de desnaturação em dois estados. Não existe na literatura a análise da relação $\Delta H_{\text{van't Hoff}}/\Delta H_{\text{DESN}}$ para a quimopapaína B e papaya proteinase.

VIII.6. ATIVIDADE DAS PROTEASES EM FUNÇÃO DO TEMPO

Constatou-se que as enzimas mantidas em solução tampão fosfato de sódio 0,1M pH 7,0 permaneceram ativas a 37°C durante 12 horas, como pode ser observado na Figura 32. Esta confirmação foi necessária para o

estudo calorimétrico da reação enzima-substrato, uma vez que o microcalorímetro deve ser termostaticado por algumas horas, antes de iniciar a reação de proteólise.

VIII.7. ESTUDO CALORIMÉTRICO DA REAÇÃO ENZIMA-SUBSTRATO- ENTALPIA DE PROTEÓLISE ΔH_{PROT}

A partir dos dados da titulação calorimétrica verificamos que a variação de entalpia da reação proteolítica é exotérmica. Não foi possível utilizar o substrato caseína tipo Hammrsten devido à baixa solubilidade desta proteína (solução até 1%), tornando impossível a detecção do efeito térmico da reação no microcalorímetro. O substrato Z-ala-pNP também não pode ser utilizado devido a sua rápida hidrólise Figura 13 quando em solução. Mostramos na Figura 33 o perfil dos termogramas (fluxo de energia com o tempo) após a adição do substrato nas três enzimas.

O efeito térmico produzido numa reação proteolítica enzima-substrato depende do pH e força iônica do meio envolvendo a participação de inúmeros tipos de interações químicas: interação enzima-substrato; quebra de ligações peptídicas entre aminoácidos diferentes da estrutura primária da proteína; desolvatação ou solvatação dos aminoácidos que após a quebra se tornam extremidades de um fragmento de cadeia proteica; desestruturação da água organizada ao redor das regiões hidrofóbicas; desestabilização das interações eletrostáticas entre grupo NH_3^+ e COO^- da região clivada; rearranjo das interações hidrofóbicas entre grupos $\text{CH}_3-\text{CH}-\text{CH}_2^-$ e $\text{C}_6\text{H}_5-\text{CH}_2$, rearranjo das interações eletrostáticas e pontes de hidrogênio para a manutenção da arquitetura tridimensional dos polipeptídios restantes.

Estudos realizados com substratos sintéticos mostram que a entalpia da hidrólise de dipeptídeos variam numa faixa de (6,5-11,0) kJ por mol de ligações peptídicas hidrolisadas (104).

RAWITSCHER et alii (105) estudaram o calor de reação para as enzimas carboxilpeptidase e leucineaminopeptidase, usando o substrato sintético L-tirosilglicinamida. Na faixa de pH (8,0-8,6) foi possível verificar uma pequena variação de entalpia 4,8-5,8 kJ/mol. Neste estudo a ligação clivada pela enzima é somente uma ligação amida.

Uma grande diferença nos valores de entalpia de reação usando-se como substratos peptídeos e amidas pode ser observada na literatura e estão resumidas na Tabela XIII. Esta diferença é atribuída à grande variação de entalpia de ionização do íon amônio. Resumidamente, a diferença entre o calor de hidrólise dos peptídeos e amidas é devido à maior interação entre o NH_3^+ e o solvente.

TABELA XIII. ENTALPIA DE HIDRÓLISE DE PEPTÍDEOS A 25°C (105).

SUBSTRATOS	LIGAÇÃO HIDROLIZADA	ΔH kJ/mol
Poli-lisina	Lisina-lisina	5,2
L-Tirosilglicinamida	Tirosina-glicina	5,4
Benzoil-L-tirosilglicina	Tirosina-glicina	5,6
Benzoil-L-tirosilglicinamida	Tirosina-glicina	6,5
Benzoil-L-tirosina	Ácido benzóico-tirosina	8,3
Carbobenzoxiglicil-L-leucina	Glicina-leucina	8,8
Benzoil-L-tirosilglicinamida	Ácido benzóico-tirosina	9,3
Carbobenzoxiglicil-L-fenilalanina	Glicina-fenilalanina	10,7
Benzoil-L-tirosinamida	Amida	24,4
Glicil-L-fenilalanina	Amida	26,0
Benzoil-L-argininamida	Amida	27,8

Os valores de ΔH_{PROT} encontrados por nós utilizando um substrato protéico contendo centenas de ligações peptídicas é da ordem de cem vezes maior do que quando se utiliza um substrato sintético. Os valores de ΔH_{PROT} são diferentes entre si confirmando a diferente especificidade pelo mesmo substrato.

Destas enzimas apenas a papaína tem sua especificidade bem conhecida, que é ser suscetível às ligações formadas pelos aminoácidos lisina e arginina e à ligação próxima ao grupo carboxílico da fenilalanina. Alguns derivados do ácido glutâmico, glicina e leucina também são hidrolisados pela papaína (160).

A especificidade para quimopapaína e papaya proteinase ainda não está bem esclarecida. Um estudo a respeito da especificidade da papaya proteinase realizado por BUTTLE et alii (161) demonstrou que a papaya proteinase tem menor afinidade por ligações glicil-glicil do que a papaína. Papaína e quimopapaína não clivam as ligações isoleucina e papaya proteinase cliva.

Determinamos os aminoácidos constituintes da caseína N-N'-dimetilada (ver Apêndice) e esta proteína apresentou em sua constituição certa de 2% de resíduos de isoleucina. Este fato colabora para explicar o maior valor de ΔH_{PROT} encontrado para a papaya proteinase.

O reconhecimento molecular da enzima pelo substrato resulta do arranjo de interações envolvendo pontes de hidrogênio, forças de van der Waals, forças eletrostáticas e efeitos estéricos e hidrofóbicos (162). Um importante aspecto do reconhecimento molecular, implica nas maneiras com que as propriedades químicas do sítio ativo da enzima dependem das interações específicas envolvendo as partes seccionadas do substrato. A papaína é

particularmente valiosa para estudos cinéticos por causa da maneira sensível na qual a reatividade do sítio catalítico responde à combinação de pontes de hidrogênio e efeitos hidrofóbicos (160).

Somente quando o substrato ou regiões do substrato pode ocupar em certas combinações de interações o sítio ativo, a catálise ocorre.

A mais notável diferença entre as enzimas papaína, quimopapaína e papaya proteinase é a sua carga total e a distribuição desta carga (162) o que acarreta diferenças na estrutura (eletrostática).

Estas enzimas possuem no seu sítio ativo o par cisteína-25 e histidina-159. Um recente estudo de cristalografia de raio X (163) indica que a energia do par iônico é similar ao do par neutro e que o sítio ativo pode apresentar uma dinâmica entre a forma "zwitteriônica" e neutra destes aminoácidos.

No caso da papaya proteinase, a estrutura do seu sítio ativo é grandemente alterada pela presença do ácido glutâmico e da arginina, respectivamente nas posições 23 e 65 (subsítio S1). Nestas mesmas posições, as outras cisteínas proteinases (papaína e quimopapaína) possuem o resíduo de glicina-35. A arginina e o ácido glutâmico estão localizados nas paredes da fenda do sítio ativo perto da cisteína-25 e as cadeias laterais destes dois resíduos formam uma barreira através da parte superior da fenda (132).

A papaya proteinase tem uma especificidade restrita como resultado de uma restrição estérica, imposta por esta barreira, como confirmam os dados de K_M obtidos neste trabalho. Entretanto, das três cisteínas proteinases estudadas, a papaya proteinase se destaca por sua extrema basicidade com um ponto isoelétrico maior que 11 (164 e165). Papaína e quimopapaína tem ponto isoelétrico 8,8 e 10,4 respectivamente (1).

Como podemos ver pelos resultados eletroforéticos a papaya proteinase cliva a caseína N,N'-dimetilada obtendo-se desta clivagem peptídeos que apresentam pesos moleculares menores e maiores do que aqueles apresentados pela papaína e quimopapaína. Como todas as forças anteriormente citadas atuam sobre os peptídeos que são hidrolisados, este resultado indica que o número maior de peptídeos formados seja um dos fatores responsáveis pela maior valor de ΔH_{PROT} (Tabela IX).

O estudo da proteólise destas enzimas é muito interessante para mostrar, de uma maneira indireta, as diferentes especificidades das proteases de uma maneira rápida e fácil.

Os pesquisadores BOLEN e BILTONEN (166); FLOGEL e BILTONEN (167), BATTISTEL et alii (168); BOLEN e SLIGHTOM (169) e PEREIRA DA SILVA e PEDROSO DE LIMA (170) estudaram mecanismos de ação enzimática que envolvem consumo ou libertação de prótons. A protonação ou desprotonação pode ser medida através da calorimetria, principalmente, com a titulação microcalorimétrica, variando-se o pH.

Através desta técnica estes autores conseguiram esclarecer algumas etapas do mecanismo de ação de algumas enzimas.

Como anteriormente citado do látex do mamoeiro apresentam um mecanismo de ação composto de duas etapas: uma de acilação e outra de desacilação as quais envolvem protonação e desprotonação respectivamente. O estudo microcalorimétrico da titulação destas enzimas em função do pH, com substratos de pequeno peso molecular, seria de grande interesse para elucidar o mecanismo de ação destas proteases.

IX. CONCLUSÃO

Desenvolveu-se um método para purificação das proteínases do látex de mamociro, o qual mostrou ser possível a separação quase completa das mesmas entre si em um único passo, através de cromatografia do extrato de látex dialisado contra tampão acetato pH 5,0 em coluna de CM-Celulose eluída com o mesmo tampão em gradientes descontínuos de concentração crescente. A quimopapaína B e papaya proteinase purificadas por este método apresentam um único componente proteico, quando submetidas a eletroforese em gel de poliacrilamida a 15% em pH 4,5, em sistemas não desnaturantes.

As vantagens deste método foram as seguintes:

- Não submeter o látex a tratamento drásticos.
- Menor volume de eluato.
- Mesmo grau de pureza obtido através de técnicas mais sofisticadas

O método desenvolvido para a purificação da papaína quando submetido a fracionamento por sais apresentou as seguintes vantagens:

- Não foi necessário tratar a enzima com agentes oxidantes.
- Dispensa o uso de cromatografia ou filtração em gel para a obtenção da enzima pura.
- O volume de solução utilizada durante o processo de purificação foi sempre pequeno.
- O rendimento de obtenção da papaína cristalina foi de 2,5% maior do que os dos métodos da literatura

O método utilizado para imobilização das proteases mostrou ser muito eficiente, uma vez que após oito meses de imobilização, as enzimas mantinham sua atividade.

Constatamos que os dados cinéticos para as enzimas livres para os dois tipos de substratos estudados (proteicos) tiveram o seguinte comportamento: papaína e quimopapaína B sempre apresentaram um K_M próximos e papaya proteinase um K_M maior. Para as enzimas imobilizadas a papaína apresentou maior afinidade pelo substrato do que as outras proteases.

Constatou-se que as proteases quimopapaína B e papaya proteinase são termicamente reversíveis e que o comportamento de desnaturação destas proteases obedece um modelo de dois estados. Confirmou-se a existência de estados intermediários para a papaína.

Utilizando DSC convencional foi possível determinar a entalpia de desnaturação ΔH_{DESN} destas proteases. Os valores da relação $\Delta H_{\text{vanT Hoff}}/\Delta H_{\text{DESN}}$ concordam com os valores da literatura para os processos de desnaturação que ocorrem com estados intermediários.

A titulação microcalorimétrica para a determinação da variação da entalpia de proteólise mostrou que estas enzimas, apesar de terem uma estrutura primária muito semelhante, apresentam um ΔH de proteólise muito diferente. Embora, a papaya proteinase tenha uma menor afinidade pelo substrato proteico estudado sua entalpia de proteólise foi muito alta.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

001. MEDINA, J. C. (1989) Mamão. 2 ed. Campinas: ITAL, 1-25.
002. CAYGILL, J. C. (1979) Sulphydryl plant protease. Techn. Enzyme Microb., 1, 233-241.
003. SANDHOLM, L. (1986) Proteases and their inhibitors in chronic inflammatory periodontal disease. J.Clin. Periodontal, 13, 19-26.
004. SASHIDA, H.; ABIKO, Y (1985) Inhibition with NCO-700, a protease inhibitor of degradation of cardiac myofibrillar proteins during ischemia in dogs. Biochem. Pharmacol., 34, 3857-3880.
005. BOND, J. S.; BEYNON, R. J. (1987) Proteolysis and physiological regulation. Molec. Aspects Med., 9, 173-287.
006. JENNER, J. R.; BUTTLE, D. J.; DIXON, A. K. (1986) Mechanism of action of intradiscal chymopapain in the treatment of sciatica: a clinical, biochemical and radiological study. Ann. Rheum. Diseases, 45, 441-446.
007. BOND, J. S.; BUTLER, P. E. (1987) Intracellular proteases. Ann. Rev. Biochem., 56, 330-364.
008. MÉRNARD, R.; KHOURI, H. E.; PLOUFFE, C.; LAFLAMME, E. P.; DUPRAS, R.; VERNET, T.; TESSIER, D.C.; THOMAS, D.Y.; STORER, A. (1991) Importance of hydrogen bonding interactions involving the side chain of asp-25 in catalytic mechanism of papain. Biochem. 30, 5531-5538.
009. ROY, C. G. (1915) J. Biol. Chem., 29 apud BAINES, B. S.; BROCKLEHURST, K. (1982) Isolation and characterization of the four major cysteine - proteinase components of the latex of *Carica papaya* 1. Reactivity characteristics towards 2, 2' - dipyridil disulfide of the thiol groups of papain, Chymopapain A and B, and papaya peptidase. A. J. Protein Chem., 1, 119-125.
010. WURTZ, A.; BOUCHET, E. (1879) Recherches sur la papaine. C. R. Acad. Sci. Paris, 89, 425-432.
011. BOUDART, R. L. (1972) Method for processing pawpaw latex (papaya) to obtain Papain. U. S. Patent 3694.315.
012. FOYET, M. (1972) Extration of papain. Frutis, 27, 303-306.

013. VNER, S. H. (1909) The proteases of plants (VI). Ann. Bot., 23, 1-10.
014. FRANKEL, E. M. (1917) Studies on Enzymes action. XV. Factors influencing the proteolytic activity of papain. J. Biol. Chem., 31, 201-207.
015. BALLS, A. K.; LINEWEAVER, H. (1937) Crystallization of papain. Science, 89, 379-384.
016. BALLS, A. K.; LINEWEAVER, H. (1939) Isolation and properties of cristaline papain. J. Biol. Chem., 130, 669-674.
017. BROCKLEHURST, K.; BAINES, B. S.; KIERSTAN, M. P. J. (1981) Papain and other constituintes of *Carica papaya*. In BROCKLEHURST, K.(ed.).Topics enzyme ferment biotechnology. London 5, 262-335.
018. KIMMEL, J. R.; SMITH, E. L. (1975) The properties of papain. Adv. Enzymol., 19, 267-283.
019. MONTI, R. (1983) Purificação parcial de inibidores de papaína presentes no latex de *Carica papaya*. Ribeirão Preto:USP, Dissertação de Mestrado - Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo.
020. JANSEN, E. F.; BALLS, A. K. (1941) Chymopapain: a new crystalline proteinase from Papaya latex. J.Biol. Chem., 127, 459-462.
021. EBATA, M; YASUNOBU, T. K. (1962) Chymopapain. I. Isolation, crystallization and preliminary characterization. J. Biol. Chem., 237, 1086-1089.
022. KUNIMITSU, D. K.; YASUNOBU, K. T. (1967) Chymopapain. IV. The chromatografic fractionation of partially purified Chymopapain and the characterization of crystalline Chymopapain. Biochem. Biophys. Acta, 139, 405-409
023. LYNN, K. R. (1973) An isolation of Chymopapain. J. Chromatogr., 84, 423-427.
024. LYNN, K. R. (1979) A purification and some properties of two proteases from Papaya latex. Biochim. Biophys. Acta, 569, 193-198.
025. JOSHI, P. N.; SHANKAR, V.; ABRAHM, K. I.; SREENIVASAN, K. (1976) Separation of Chymopapain from papaya latex (*Carica papaya*) on amberlite IR-120 (Hg⁺²). J.Chromatogr., 121, 65-68.

026. CLAGETTE, J. A.; TOKUDA, S.; ENGELHARD, W. E. (1974) Chymopapain C, an immunosuppressive protease. I. Partial purification and characterization. Proc. Soc. Exp. Biol. Med., **145**, 1250-1256.
027. BUTTLE, D. J.; BARRET, A. J. (1984) Chymopapain chromatographic purification and immunological characterization. Biochem. J., **223**, 81-84.
028. KHAN, I. V.; POLGÁR, L. (1983) Purification and characterization of a novel proteinase, Chymopapain S. Biochim. Biophys. Acta, **760**, 350-353.
029. KÓRÓDI, I.; ASBOTH, B.; POLGAR, L. (1986) Disulfide bond formation between the active-site thiol and one of the several free thiol groups of chymopapain. Biochem. J., **25**, 6895-6991.
030. CAYLE, T.; SALETAN, T. L.; LOPEZ-RAMOS, B. (1964) Some papain fractions and their characteristics. Wallerstein Lab., **27**, 87-93.
031. SCHACK, P. (1967) Fractions of proteolytic enzymes of dried papaya latex. Isolation and preliminary characterization of a new proteolytic enzyme. C. R. Trd. Lab. Carlsberg, **36**, 67-72.
032. BROCKLEHURST, K.; MCKEE, R.; SMITH, H. (1985) Evidence from two-protonic-state reactivity probe kinetics that chymopapain in fresh nonfruit latex of *Carica papaya* consists of multiple forms of chymopapain A. The value of catalytic site characteristics in the identification, classification and characterization of the papaya cysteine proteinase papain, the chymopapains, and papaya proteinase A. J. Protein. Chem., **4**, 103-113.
033. POLGÁR, L. (1984) Problems of classification of papaya latex proteinases. Biochem. J., **221**, 555-558.
034. BARRET, A. J.; McDONALD, J. K. (1986) Nomenclature: protease, proteinase and peptidase. Biochem. J., **237**, 935-936.
035. WEBB, E. C. (1984) Enzyme Nomenclature. San Diego: Academic Press.
036. MacDONALD, J. K. (1985) An overview of protease specificity and catalytic mechanisms. Aspects related to nomenclature and classification. Histochem.J., **17**, 773-785.
037. HARTELY, B. S. (1960) Proteolytic enzymes. Ann. Rev. Biochem., **29**, 45-72.

038. GOUR-SALIN, B. J.; STORER, A. C.; CASTELHANO, A.; KRANTZ, A.; ROBINSON (1990) Inhibition of papain by peptide nitriles; reactions of external nucleophiles with the thioimidate ester adduct. Enzyme Microb. Technol., **13**, 408-411.
039. BJÖRK, I.; YLINENJÄRVI, K.; LINDAHL, P. (1990) Equilibrium and kinetic studies of the interaction of chicken cystatin with four cysteine proteinases. Biol. Chem. Hoppe-Seyler, **371**, 119-124.
040. YAMAMOTO, A. ; TOMOO, K.; DOL, M.; OHISHI, H.; INOUE, M.; ISHIDA, T.; YAMAMOTO, D.; TSUBOI, S.; OKAMOTO, H.; OKADA, Y. (1992) crystal structure of papain-succinyl-Gln-Val-Val-Ala-Ala-p-Nitroanilide complex at 1,7 Å resolution: noncovalent binding mode of a common sequence of endogenous thiol protease inhibitors. Biochem., **31**, 11305-11309.
041. BJÖRK, I.; YLINENJÄRVI, K. (1989) Interaction of chicken cystatin with inactivated papains. Biochem. J., **260**, 61-68.
042. BROCKLEHURST, K.; CAREY, P. R.; LEE, H.; SALIH, E.; STORER, A. C. (1984) Comparative resonance raman spectroscopic and kinetic studies of Acyl-Enzymes involving papain, actinidin and papaya peptidase II. Biochem. J., **223**, 649-657.
043. TRAVIS, J.; SALVESEN, G. S. (1983) Human plasma proteinase inhibitors. Ann. Rev. Biochem. **52**, 655-709.
044. ARAD, D.; LANGRIDGE, R.; KOLLMAN, P. A. (1990) A simulation of the sulfur attack in the catalytic pathway of papain using molecular mechanics and semiempirical quantum mechanics. J. Am. Chem. Soc., **112**, 491-502.
045. HANZLIK, R. P.; JACOBBER, S. P.; ZYGMUNT, J. (1991) Reversible binding of peptide aldehydes to papain structure - activity relationship. Biochim. Biophys. Acta, **173**, 33-42.
046. MIGLIORINI, M.; CREIGHTON, D. J. (1986) Active-site ionizations of Papain. An evaluation of the potentiometric difference titration method. Eur. J. Biochem., **156**, 189-192.
047. KRAUT, J. (1977) Serine proteases: structure and mechanism of catalysis. Ann. Rev. Biochem., **46**, 331-353.

048. SCHUSTER, M. KASCHE, V. JAKUBKE, H. D. (1992) Contributions to the the s'ubsite specificity of papain. Biochim. Biophys. Acta, **1121**, 207-212.
049. FRUTON, J. S. (1975) Proteases and biological control. In REICH, D. B.; SHOW, E. (Ed.) Cold spring harbour conferences on cell proliferation. New York 2, p. 33-50.
050. JACQUET, K.; KLEINSCHMIDT, T.; DUBOIS, T.; SCHNEK, A. G.; LOOZE, Y.; BRAUNITZER, G. (1989). The tiol proteinase from the latex of *Carica papaya* L. IV Proteolytic specificities of chymopapain and papaya proteinase on determined digestions of α -globin chains. Biol. Chem. Hoppe-Seyler, **370**, 819-829.
051. ZENTGRAF, B.; RINGPFEIL, M. (1991) Natural sources of more stable enzymes. Pure Appl. Chem., **63**, 1528-1533.
052. NELSON, J. M.; GRIFFIN, E. G. (1916) Adsorption of invertase. J. Am. Chem. Soc., **38**, 1109-1115.
053. GRUHOFER, N.; SCHEITH, L. (1954) J. Physcal. Chem., **279**, 168-112 apud ZENTGRAF; T. J. AHERN (1991). Pratical importance of enzyme stability. Pure Appl. Chem., **63**, 1527-1540
054. BAR-ELI; KATCHALSKI (1960) A water insoluble trypsin derivate and its use as a trypsin column. Nature, **188**, 856-857.
055. GRAY, D. N.; KEYES, M. H.; WATSON, B. (1977) Immobilized enzymes in analytical chemistry. Anal. Chem., **49**, 1067A-1078A.
056. BOWERS, L. D.; CARR, P. W. (1976) Applications of immobilized enzymes in analytical chemistry. Anal. Chem., **48**, 544A-559A.
057. RUZICKA, J.; HANSEN, E. H. (1974) A new potentiometric gas sensor - the air-gay electrode. Anal Chim. Acta, **69**, 129-141.
058. SCHIFFREEN, R. S.; HANN, A. D.; BOWERS, L. D.; CARR, P. W. (1977) Analytical aspects of immobilized enzymes columns. Anal. Chem., **49**, 1929-1939.

059. SILVA, V. L. (1991) Construção e avaliação de eletrodo enzimático para determinação de uréia utilizando canavalia marítima. Campinas: UNICAMP, Tese (Doutorado)-Instituto de Química, Universidade Estadual de Campinas.
060. O'DRISCOLL, K. F.; MERCER, D. G. (1987) Enzymes immobilized. In: Encyclopedia of Polymer Science and Technology, New York 2, 235-269.
061. KOBAYASHI, T.; LAIDLER, K. J. (1973) Kinetic analysis for solid-supported enzymes. Biochem. Biophys. Acta, 302, 1-10
062. MOO-YOUNG, M.; KOBAYASHI, T. (1972) Effectiveness factors for immobilized-enzyme reactions. Canj. J. Chem. Eng., 50, 162-165.
063. KAY, G.; LILY, M. D. (1970) The chemical attachment of chymotrypsin to water-insoluble polymers using 2- amino 4,6-dichoro-5-triazine. Biochem. Biophys. Acta, 198, 276-282.
064. CHANG, T. M. S. (1964) Semipermeable microcapsules. Science, 146, 524-525.
065. HUMMEL, J. P.; ANDERSON, B. S. (1965) Ribonuclease adsorption on glass surfaces. Arch. Biochem. Biophys., 112, 443-447.
066. KOBAMOTO, M.; LOFROTH, G.; CAMP, P.; VANAMBURG, G.; AUGENSTEIN, Z. (1966) Specificity of trypsin adsorption onto cellulose glass, and quartz. Biochem. Biophys. Res. Comm., 24, 622-625.
067. VOROBÉVA, E. S.; POLLORAK, O. M. (1966) Vestn. Mosk. Univ. Khim., 21, 17. apud BUNTING, P. S.; LAIDLER, K. J. (1972) Kinetic studies on solid supported – galactosidase. Biochem., 11, 4477-4479.
068. TVERHINOVA, E. A.; LOBODA, N. I.; CHUKHARI, POLTORAK, O. M. (1971) Adsorption in spheric gel and catalytic properties of malate dehydrogenase. Vestn. Morsk. Univ. Khim., 12, 526-529.
069. GALE, E. F. (1944) Studies on bacterial amino-acid decarboxylases. Biochem. J., 38, 232-235.

070. WELIKY, N.; BROWN, F. S.; DALE, E. C. (1969) Carrier-bound proteins: properties of peroxidase bound to insoluble carboxymethylcellulose particles. Arch. Biochem. Biophys., **131**, 1-8.
071. MONSAN, P.; DURANT, G. (1972) Continuous use of invertase fixed on solid supports possibilites of use in agricultural and food industries. Ann. Technol. Agr., **21**, 555, 565.
072. FATIBELLO-FILLO, O.; CAPELATO, M. D. (1992) Biossensores. Quím. Nova, **15**, 28-39.
073. FUJITA, Y.; NODA, Y. (1979) Effect of hydration on the thermal stability of protein as measured by differential scanning calorimetry lysozyme-D2O system. Bull. Chem. Soc. Jpn., **52**, 2349-2352.
074. CASTRONUOVO, G. (1991) Protein in aqueous solutions. Calorimetric studies and thermodynamic characterization. Therm. Acta, **193**, 363-390.
075. IRVING, G. (1998) The three-dimensional structures of proteins. In ZUBAY, G. (Ed.) Biochemistry New York: Macmillan, 35-50.
076. TANFORD, C.; AUNE, K. C. (1970) Thermodynamics of the denaturation of lysozyme by guanidine hydrochloride. III. Dependence on temperature. Biochem., **9**, 206-211.
077. COHN, E. J. (1915) J. Biol. Chem., **27**, 200-220 appud CONANT, J. B. (1923) An electrochemical study of hemoglobin. J. Biol. Chem., **57**, 401-404.
078. DEBYE, E. J.; HUCKE, K. (1917) J. Biol. Chem., **31**, 120-123 appud CONANT, J. B.; FIESBER, L. F. (1925) Methemoglobin. J. Biol. Chem.; **62**, 595-622.
079. TANFORD, C. (1973) The hydrophobic effect. New York: Wiley-Interscience, 1-10
080. ANFINSEN, C. B. (1973) Principles that govern the folding of polypeptide chains. Science, **181**, 167-171
081. RICHARSON, J. S. (1981) The anatomy and toxonomy of protein structure. Adv. Protein Chem., **34**, 167-339.
082. KENDREW, J. C. (1961) The three-dimensional structure of a protein molecule. Sci. Am., **205**, 96-110.
083. PERUTZ, M. F.; TEN. EYCK, L. F.; KILMARTIN, J. V.; HEWITT, J. A. (1972) Noncooperativity of the $\alpha\beta$ dimer in the reaction of hemoglobin with oxygen. Proc. Natl. Acad. Sci., **69**, 203-207.

084. CHOTIA, C. (1984) Principles that determine structure of proteins. Ann. Rev. Biochem., 53-537-572.
085. STRYER, L. (1989) Bioquímica. Rio de Janeiro: Guanabara-Koogan 13-69.
086. PRIVALOV, P. L.; STANLEY, J. G. (1988) Stability of protein structure and hydrophobic interaction. Adv. Protein Chem., 39, 191-231.
087. PRIVALOV, P. L. (1980) Scanning microcalorimeters for studying macromolecules. Pure Appl. Chem., 52, 479-497.
088. PRIVALOV, P. L. (1982) Stability of proteins. Protein which do not present a single cooperative system. Adv. Protein. Chem., 35, 1-104.
089. BRANDTS, J. H.; HALVORSON, R. H.; BRENNAN, M. (1975) Consideration of the possibility that the slow step in protein denaturation reactions is due to cis-trans isomerism of proline residues. Biochem., 14, 4953-4963.
090. LUMRY, R. (1971) Protein conformation "Rack" mechanisms, and water. Adv. Chem. Phys., 21, 567-580.
091. BRANDTS, J. F. (1964) The thermodynamics of protein. Denaturation. II. A model of reversible denaturation and interpretation regarding the stability of chymotrypsinogen. J. Am. Chem. Soc., 82, 4302-4314.
092. TANFORD, C. (1970) Protein denaturation. Adv. Protein Chem., 24, 1-95.
093. PRIVALOV, P. L.; KHECHINASHVILI, K. (1974) A thermodynamic approach to the problem of stabilization of globular protein structure. J. Mol. Biol., 86, 665-684.
094. TANFORD, C. (1968) Protein denaturation. Adv. Protein Chem., 23, 121-282.
095. RAWN, J. D. (1989) The conformations of globular proteins. In: Biochemistry. Burlington, Neil Patterson Publishers.
096. ATKINS, P. W. (1986) Physical Chemistry 3ed. Oxford. University Press, 847.
097. LEHNINGER, A. L. (1976) Bioquímica, São Paulo Edgard Blücher 1, 13-68.

098. KATHERINE, E.; HECHT, M.; COOPER, A. (1993) Microcalorimetry of enzyme substrate binding: phosphoglycerate Kinase J. Chem. Soc. Faraday Trans., **89**, 2693-2699.
099. VOLPE, P.L.O. (1993) O que são termopilhas, como funcionam e como os químicos podem utilizar estes componentes. Quím. Nova, **16**, 49-53.
100. BEEZER, A.E. (1980) Biological microcalorimetry. London: Academic Press, 343-412.
101. JHONSON, E.R.; BILTONEN, R.L. (1975) Determination of reaction rate parameters by microcalorimetry. J. Am. Chem. Soc., **97**, 2349-2354.
102. IUPAC (1982) Recommendations on Nomenclature and symbols and technical reports from commissions, Pure Appl. Chem., **54**, 207-233.
103. WADSÖ, I. (1985) Some developments in reaction and solution microcalorimetry, with particular reference to its use in biochemistry and cellular biology, Thermochem. Acta, **96**, 313-325.
104. STUTERVANT, J. M. (1955) The heat of hydrolysis of poly-L-cystine, J. Am. Chem. Soc., **77**, 1495-1498.
105. RAWITSCHER, M.; WADSÖ, I.; STUTERVANT, J. M. (1961) Heats of hydrolysis of peptide bonds, J. Am. Chem. Soc., **83**, 3180-3184.
106. FLOGEL, N.; BILTONEN, R. (1975) The pH dependence of the interaction of 3'-cytidine monophosphate with ribonuclease A, Biochem., **14**, 2610-2615.
107. SHIAO, D. D. F.; STUTERVANT, J. M. (1976) Heats of binding protons to globular proteins Biopolymers, **15**, 1201-1211.
108. BOLEN, D. W.; KIMURA, T.; NITTA, K. (1987) Energetics of α -chymotrypsin - Mediated hydrolysis of a strained cyclic ester, Biochem., **26**, 146-153.
109. FERSHT, A. R. (1985) Enzyme structures and mechanism, 2. ed., New York: W.H. Freeman, p. 150.
110. OWUSU, R. K.; FINCH, A. (1982) Flow microcalorimetric study of immobilized glucose oxidase-catalase system, Biochem. Biophys. Acta, **872**, 83-91.

111. BATTISTEL, E.; BIANCHI, D.; RIALDI, G. (1991) Thermodynamics of immobilized ribonuclease A Pure Appl. Chem., 63, 1483-1490.
112. REISELFED, R. A.; LEWS, V. J.; WILLIAMS, D. E. (1962) Disc electrophoresis of basic proteins and peptides on polyacrylamide gels. Nature, 195, 281-284.
113. LAEMMLI, U. K.; FARUE, M. (1973) Maturation of the head of bacteriophage T4. I. DNA packaging erants. J. Mol. Biol., 80, 575-581.
114. ASSUMPÇÃO, R. M. V.; MORITA, T. (1968) Manual de soluções, reagentes e solventes, São Paulo Edgard Blücher p. 420.
115. LOWRY, O. H.; ROSEBROUCH, J. N.; FARR, L. A.; RANDALL, R. J. (1951) Protein measurement with the folin phenol reagent. J. Biol. Chem., 193, 265-275.
116. CABACUNGAN, J. C.; AHMED, I. A.; FEENEY, R. E. (1982) Amine boranes as alternative agents for reductive, alkilation of proteins. Anal. Biochem., 124, 272-278.
117. SANGER, F. (1952) The arrangement of amino acids in proteins. Adv. Protein Chem., 7, 1-10.
118. ARNON, R. (1970) Papain Methods Enzimol 19, 226-257.
119. SCHWERI, G. W.; TAKENAKA, Y. (1955) A spectrophotometrics determination of trypsin and chymotrypsin. Biochem. Biophys Acta, 16, 570-575.
120. BERGMAN, M.; FRUTON, J. S.; POLLOK, H. (1939) The specificity of trypsin. J. Biol. Chem., 172, 643-648.
121. MICHAELINS, L.; MENTEN, M. L. (1913) Kinetics of invertase action. Biochem. Z., 49, 333-369.
122. LINEWEAVER, H.; BURK, D. (1934) The determination of enzymes dissociation constants, J. Am. Chem. Soc., 56, 658-663.
123. HANES. C. S. (1932) Studies on plant analyses, Biochem. J., 26, 1406-1421.
124. PRIVALOV, P.; POTEKHIN, S. A. (1986) Scanning microcalorimetry in studying temperature-induced changes in protein, Methods Enzimol., 131, 4-51.

125. KIM, S. C.; LEE, H. H. (1989) Characterization of chymopapain from *Carica papaya* latex. K. K. J. Gen. Eng., **3**, 21-24.
126. BASÍLIO, C. A. (1987) Purificação da Quimopapaína B e de um inibidor de pequeno peso molecular no látex de *Carica papaya* (mamociro). Ribeirão Preto: USP, Dissertação (Mestrado)-Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo.
127. JORGE, J. A. (1977) Caracterização parcial das proteínas do latex de *Carica papaya*, com especial referência a purificação e caracterização cinética da papaya do látex fresco. Dissertação (mestrado) - Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo.
128. BUTTLE, D. J.; DANDO, P. M.; COE, P. F.; SHARP, S. L.; SHEPHEND, S. T.; BARRETT, A. J. (1990) The preparation of fully active chymopapain free of contaminating proteinases. Biol. Chem. Hoppe. Seyler, **371**, 1083-1088.
129. LEE, H. H.; KIM, S. C. (1989) Purification of Chypapain A and B from *Carica papaya* látex. K. K. J. Gen. Eng., **3**, 8-13.
130. BASÍLIO, C. A.; PEREIRA-DA-SILVA, L.; VOLPE, P. L. O. (1990) Purificação da quimopapaína presente no látex de *Carica papaya*. In: Congresso de Proteínas, 1, Campinas: UNICAMP..
131. DRENT, H.; JANSONIUS, N.; KOEKOEK, R.; SWEN, H. M.; WOLTHER, S. (1986) Structure of papain. Nature, **218**, 929-932.
132. BUTTLE, D. J.; KEMBHAVI, A. A.; SHARP, S. T.; SHARP, R. E.; RICH, D. H.; BARRETT, A. L. (1989) Affinity purification of the novel cysteine proteinase IV, and from papaya latex, Biochem. J., **261**, 469-476.
133. SANNER, T.; PIHL, A. (1963) Studies on the active -SH group of papain and on the mechanism of papain activation by thiols, J. Biol. Chem., **238**, 165-171.
134. GOLDMAN, R.; KEDEM, O.; KATCHALSKI, E. (1968) Papain-collodion membranes II. Analysis of the kinetic behavior of enzymes immobilized in artificial membranes. Biochem., **7**, 4518-4520.

135. HAMILTON, B.K.; GARDNER, C.R.; COLTON, C.K. (1974) Effect of diffusional limitations on Lineweaver-Burk plots for immobilized enzymes, AIChE J., 20, 503-510.
136. WEETAL, H. H.; MANSON, R. D. (1973) Studies on immobilized papain, Biotechn. Bioeng. 15, 455-466.
137. WEETAL, H. H. (1979) Storage stability of water-insoluble enzyme covalently coupled to organic and inorganic carriers, Biochim. Biophys. Acta, 212, 1-7.
138. MASKDIMENKO, A. V.; NADIRASHVILT, L. A.; ROMASCHENKO, A. D.; ERKOMAISHVILT, G. S.; ABRAMOVA, V. V.; TORCHILIN (1989) Complex of papaya proteinase modified with soluble polymer and its possible medical application, J. Controlled Release, 19, 131-143.
139. KULYS, J. J.; SAMALIUS, A. S.; SVIRMICKAS, G. J. S. (1980) Electron exchange between the enzyme active center and organic metal, FEBS Lett., 114, 7-10.
140. GUILBAULT, G.B. (1984) Principles of immobilized enzymes. In: _____, Analytical uses of immobilized enzymes. New York: Marcel Dekker, 2, 140-160.
141. BASÍLIO, C. A.; PEREIRA-DA-SILVA, L.; GUSHIKEM, V.; VOLPE, P. L. O. (1992) Estudo das enzimas proteolíticas presentes no látex de *Carica papaya*. V atividade caseinolítica e esterásica e imobilização em sílica gel. In: Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química, 15, Caxambú. SBQ FQ-47.
142. WATSON, D. C.; YAGUCHI, M.; LYNN, K. (1990) The amino acid sequence of chymopapain from *Carica papaya*. Biochem. J., 266, 75-81.
143. PRIVALOV, P. (1989) Thermodynamic problems of protein structure. Ann. Rev. Biophys. Chem., 18, 217-269.
144. KAMPHUIS, G.; KALK, K. H.; SWARTE, B. A.; DRENTH, J. (1984) Structure of papain refined at 1,65 Å resolution, J. Mol. Biol., 227, 521.

145. KAMPLUIS, I. G.; DRENT, H.; BAKER, E. N. (1985) Thiol Proteases comparative studies based on the high-resolution structure of papain and actinidin, and on amino acid sequence information for cathepsin B and H, and stem bromelain. J. Mol. Biol., **182**, 317-329.
146. ZUBAY, G.; SALEMME, R.F.; YRVIN, G. (1989) The three-dimensional structure of proteins. In: Geoffrey Zubay Biochemistry, 2 ed. New York Macmillan 53-59.
147. RICHARDS, F.M. (1991) The protein folding problem. Sci. Am. **264**, 34-41.
148. SZÖGYR, M.; CSERHATI, T. (1990) Nonionic tensides modify papain structure and proteolytic activity. Acta Biothechnol., **10**, 85-92.
149. MAKHATADZE, G. I.; PRIVALOV, P. L. (1990) Heat capacity of proteins. I. Partial molar heat capacity of individual aminoacid residues in aqueous solution hydration effect. J. Mol. Biol., **213**, 375-384.
150. PRIVALOV, P. L.; MAKHATADZE, G. I. (1990) Heat capacity of proteins. II. Partial molar heat capacity of the unfolded polypeptide chain of proteins: protein unfolding effects. J. Mol. Biol., **213**, 385-391.
151. MORIAN, P. E.; FREIRE, E. (1991) Direct calorimetric analysis of the enzymatic activity of yeast cytochrome oxidase. Biochem., **30**, 849-850.
152. BRANDTS, J. F.; OIN-HU, C.; NANLIN, L.; WAS, M. T. (1989) A simple model for proteins with intreracting domains. Applications to scanning calorimetry data. Biochem., **28**, 8588-8596.
153. BARONE, G.; DEL VECCHIO, P.; GIANCOLA, C.; NOTARO, G. (1992) Conformational stability of proteins and peptideo-peptideo interactions in the presence of carbohydrates. Therm. Acta, **199**, 189-196.
154. SÁNCHEZ-RUIZ, J. M.; LÓPES-LACOMBA, J. L.; CORTIJO, M.; MATEO, P. L. (1988) Differential scanning calorimetry of the irreversible thermal denaturation of thermolysin. Biochem., **27**, 1648-1652.
155. STURTEVANT, J. M.; HOLTZER, M. E.; HOLTZER, A. (1991) A scanning calorimetric study of the thermally induced unfoldind of various forms of tropomyosn. Biopolymers, **31**, 489-495.

156. RUDOLPH, R.; SIEBENDRITT, R.; NESSLAUER, G.; SHARMA, A. K.; JAENICKE, R. (1990) Folding of an all β protein: Independent Domain Folding in L II Crystallin from calf eye lens, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **87**, 4625-4629.
157. TIKTOPULO, E. I.; PRIVALOV, P. L. (1978) Papain. FEBES Letts., **91**, 57-58.
158. BRIGGS, G.S.; FREEDMAN, R. B.; GOODENOUGH, P.W.; SUMMER, I.G. (1992) Stability and unfolding studies on papain. Biochem. Soc. Trans., **20**, 2575.
159. PRIVALOV, P. L. (1979) Stability of proteins small globular proteins. Adv. Protein. Chem., **33**, 167-236
160. BROCKLEHURST, K.; WILLENBROCK, F.; SALIHE (1987) Proteolytic enzymes. In: NEUBERGER, A., BROCKLEHURST, K., (Ed) Hydrolytic enzymes. Amsterdam: Elsevier, Amsterdam, 39-158.
161. BUTTLE, D. J.; RITONJA, A.; PEARL, L. A.; TURK, V.; BARRETT, A. J. (1991) Selective cleavage of glycosyl bonds by papaya proteinase IV, FEB, **260**, 195-197.
162. BROCKLEHURST, K.; THOMAS, E. W.; QUEMBYS, S.; KOWLESSUR, D.; GOODING, C.; TEMPLETON, M.; BLYDEN, R. (1990) Dynamic aspects of molecular recognition in cysteine proteinase-ligand systems. Biochem. Soc. Trans., **18**, 581-582.
163. PICKERSGILL, R. W.; SUMNER, G.; GOODENOUGH, P. W. (1990) Preliminary crystallographic data for protease Ω , Eur. J. Biochem., **190**, 443-444.
164. GOODENOUGH, P. W.; OWEN, J. (1987) Chromatography and electrophoretic analyses of papaya proteinases, Phytochemistry, **26**, 75-79.
165. KARSHOLM, N.C.; SEHACK, P. (1983) Characterization of papaya peptidase as an enzyme of extreme basicity, Acta Chem. Scand., **B 37**, 607-611.

166. BOLEN, D. W.; FÖGEL, M.; BILTONEN, R. (1971) Calorimetric studies of protein-inhibitor interaction I binding of 3'-cytidine monophosphate to ribonuclease A at pH 5,5, Biochem., **22**, 4136-4140.
167. FÖGEL, M.; BILTONEN, R. (1975) Calorimetric and potentiometric characterization of the ionization behavior of ribonuclease A and its complex with 3'-cytidine monophosphate, Biochem., **14**, 2603-2609.
168. BATTISTEL, E.; SABBIONETA, P.; RIALDI, G. (1990) Binding studies on 3'-Cytidine monophosphate and ribonuclease A derivatives by flow and batch calorimetry. Thermochimica Acta, **172**, 21-30.
169. BOLEN, D. W.; SLINGHTON, J. L. (1990) Calorimetric determination of linkage effects involving acyl-enzyme intermediate, Biophys. Chem., **37**, 303-312.
170. PEREIRA-DA-SILVA, C. M.; PEDROSO-DE-LIMA, M. C. (1992) Application of flow microcalorimetry to the study of dehydrofolate reductase activity in crude tissue homogenates, J. Therm. Anal., **38**, 821-833.

APÊNDICE

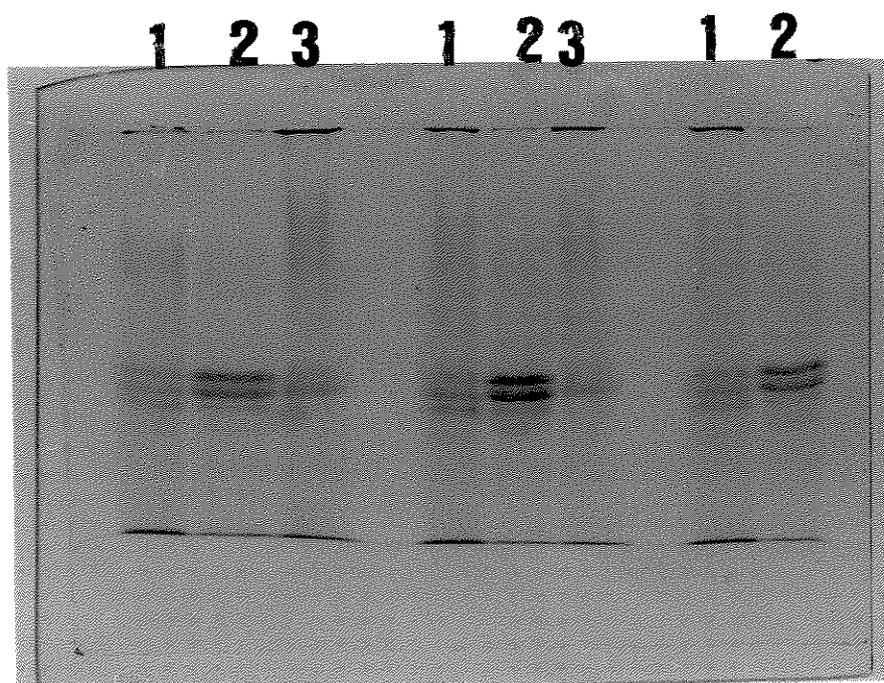


Figura 37. Eletroforese em gel de poliacrilamida para comparação da caseína N,N'-dimetilada da Sigma e a quimicamente em nosso laboratório.

Condições: Concentração do gel 10% ; sistema desnaturante contendo SDS 10%; tampão tris glicina pH 8,8; corrente elétrica 30mA; duração oito horas; indicador azul de bromofenol; temperatura ambiente e coloração com Coomassie Brilliant Blue.

poço 1= Caseína N,N'-dimetilada da Sigma contendo 50 µg de proteína.

poço 2= Caseína N,N'-dimetilada quimicamente modificada em nosso laboratório contendo 50 µg de proteína.

poço 3= Caseína tipo Hammrsten contendo 50 µg de proteína.

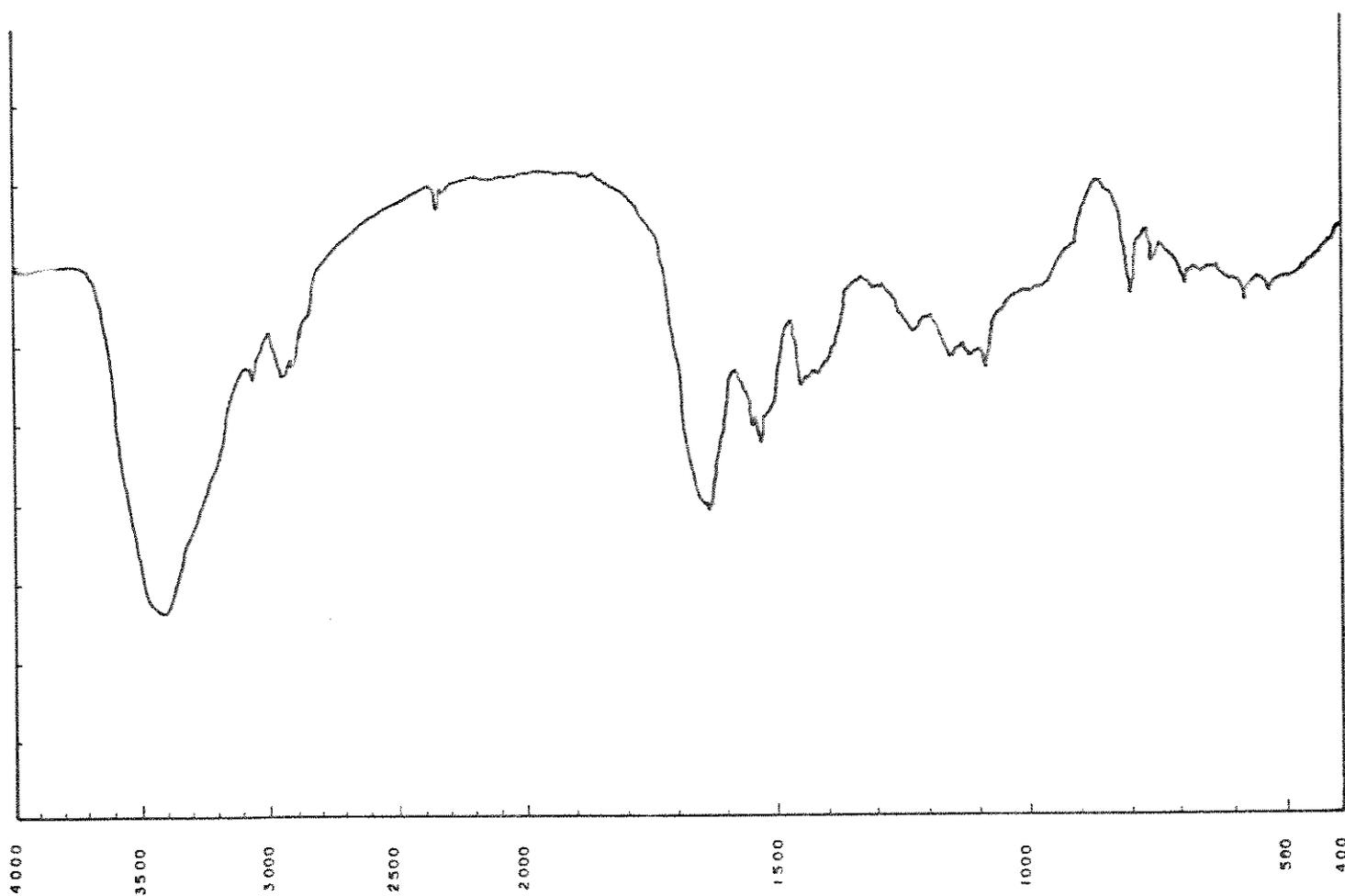


Figura 38. Espectro Infra Vermelho da Caseína N,N-Dimetilada da Sigma.
Condições: Foi realizado pastilha de KBr.

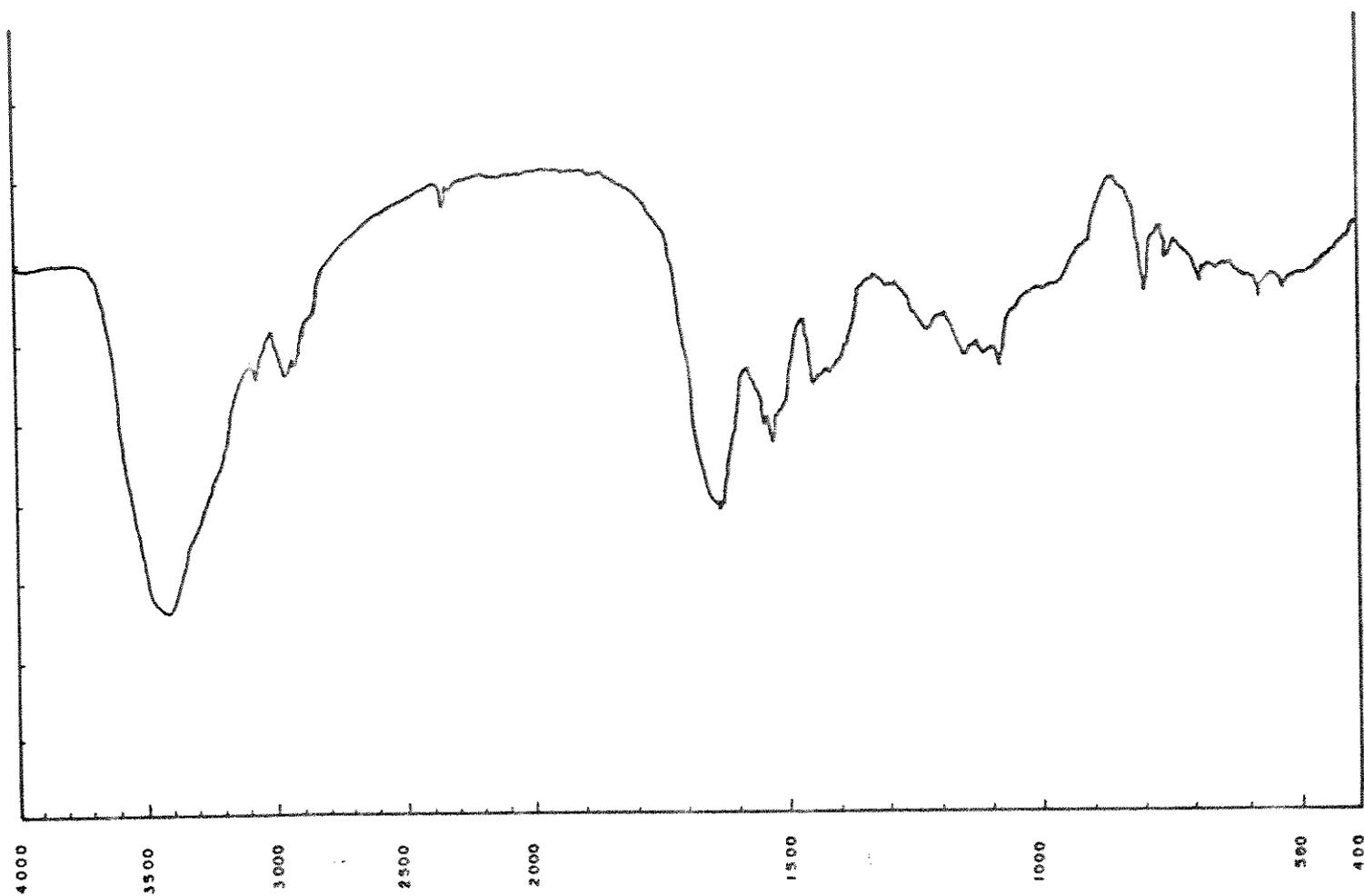


Figura 39. Espectro Infra Vermelho da Caseína N,N'-Dimetilada em Nossso Laboratório.
Condições: Foi realizado pastilha de KBr.

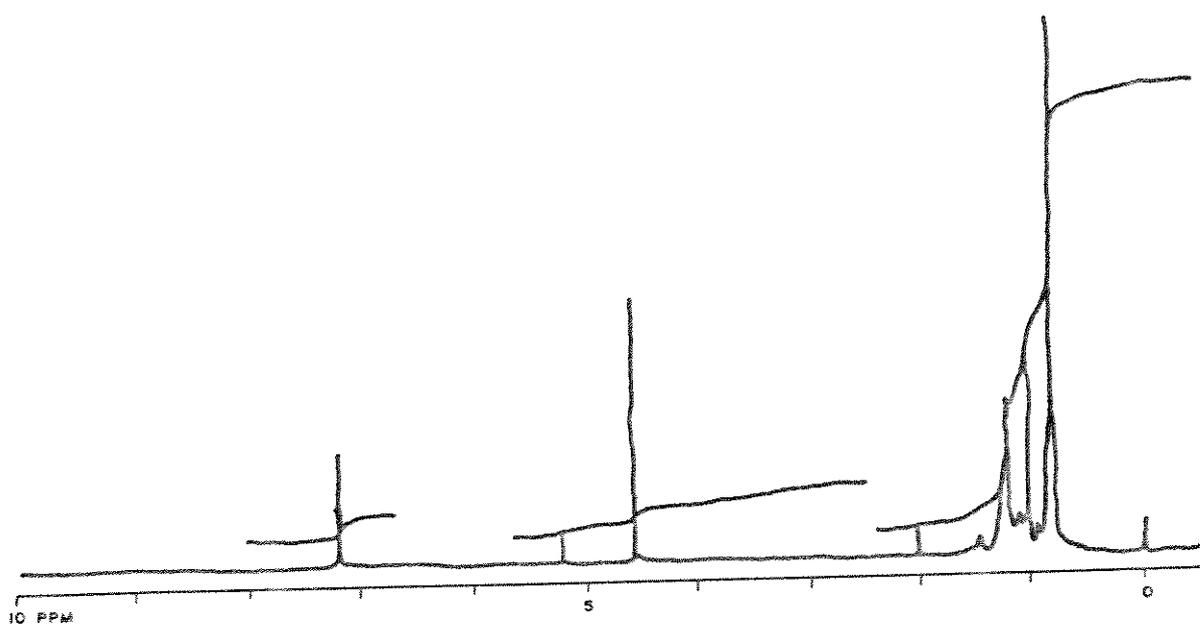


Figura 40. Espectrofotometria de RMN sfda Caseína N,N' Dimetilada da Sigma.

Condições: Frequência 300,75- tamanho do espectro 5000,0 Hz; temperatura ambiente; solvente tetracloreto de carbono.

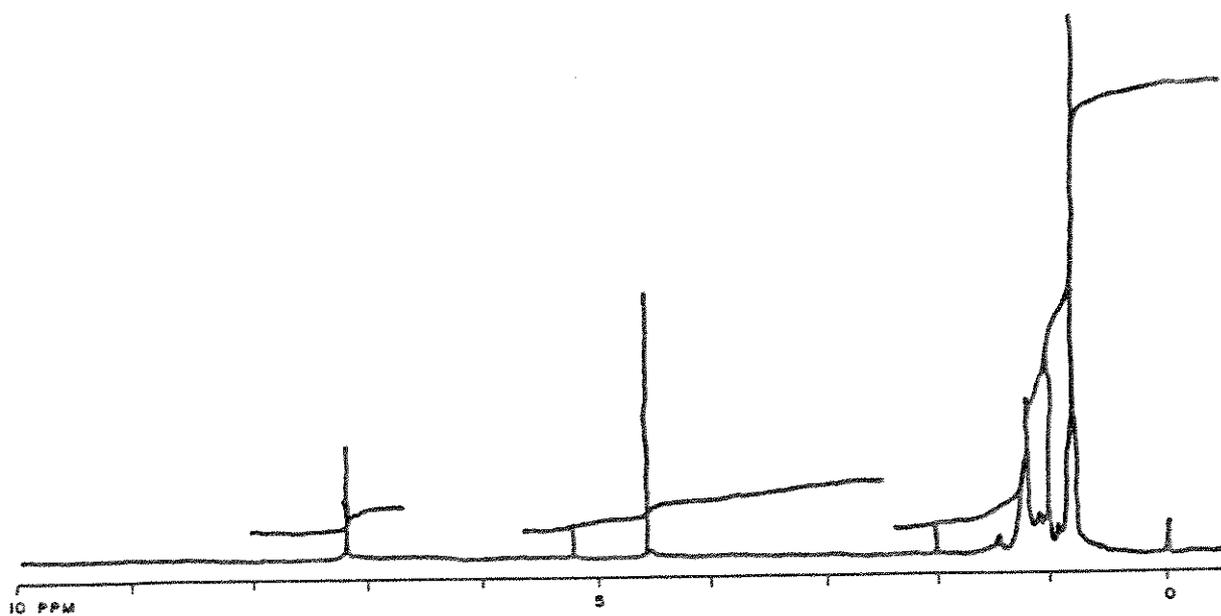


Figura 41. Espectrofotometria deRMN da Caseína N,N'-Dimetilada em Nosso Laboratório.
Condições: Iguais as descritas na figura 40.

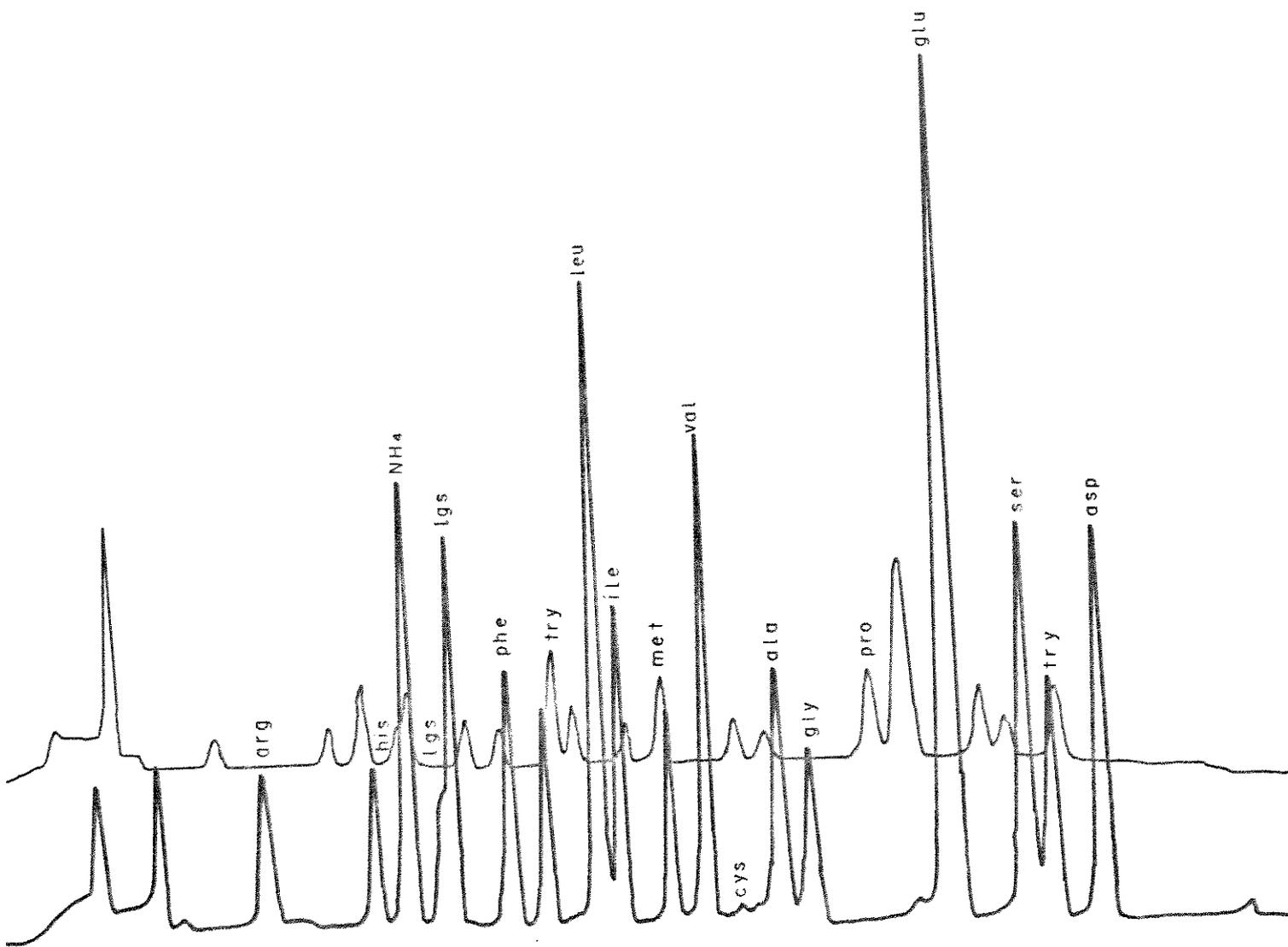


Figura 42. Determinação dos Aminoácidos da Caseína N,N'-Dimetilada da Sigmas.

Condições: As amostras foram digeridas com HCl de acordo com o método de SANGER. Após liofilizadas e em seguida eluídas em coluna de troca iônica.

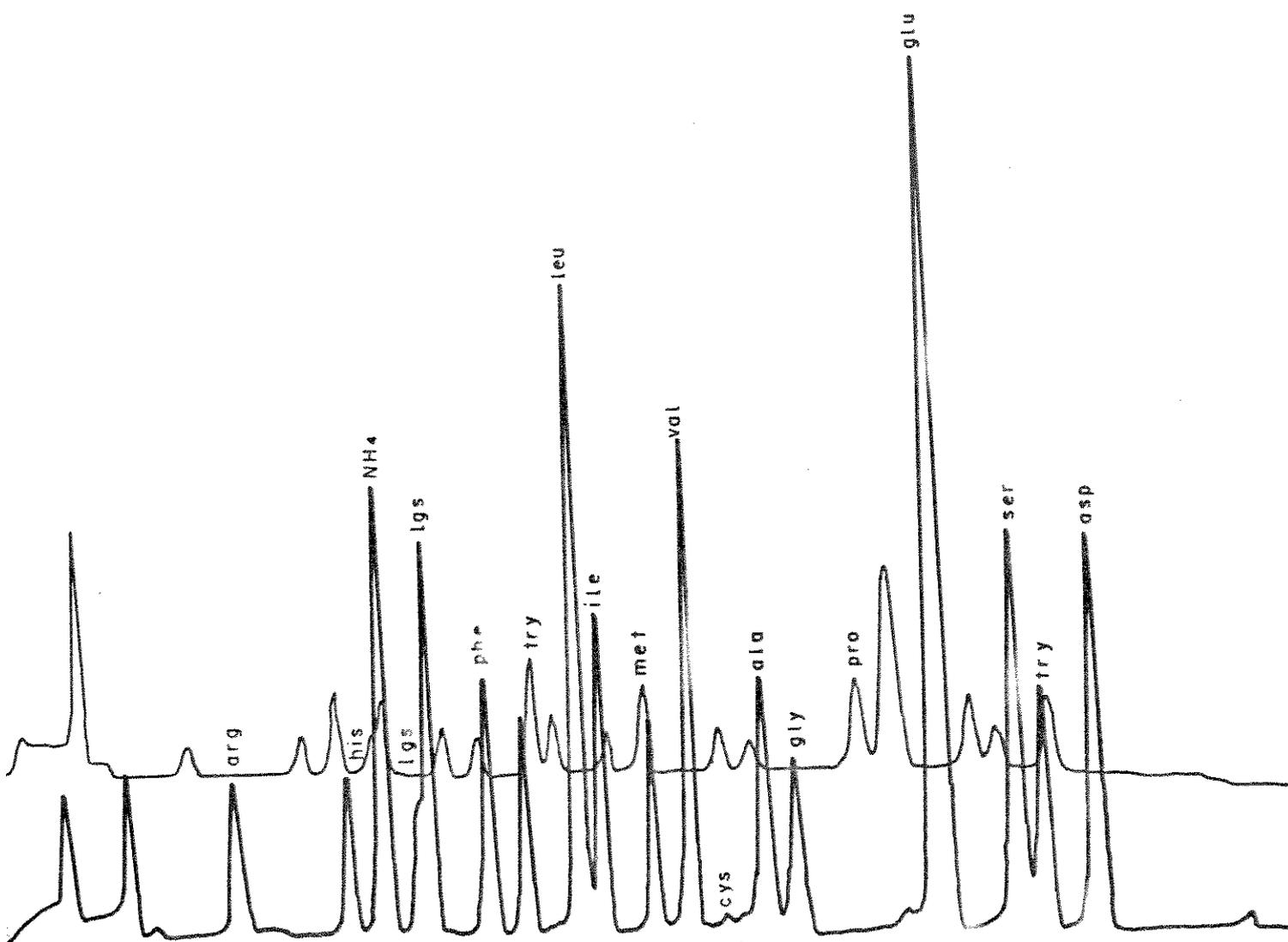


Figura 43. Determinação dos Aminoácidos da Caseína N,N'-Dimetilada em Nosso Laboratório.
Condições : Iguais as descritas na figura 42.