



UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA
NÍVEL MESTRADO

**Utilização do inibidor de papaína extraído de sementes de *Adenantha*
pavonina L. na purificação de proteases cisteínicas**

Adriane Guimarães Gambôa

Prof^a. Dr^a. Kátia Flávia Fernandes
(Orientadora)

Goiânia
2010

Adriane Guimarães Gambôa

**Utilização do inibidor de papaína extraído de sementes
de *Adenantha pavonina* L. na purificação de
proteases cisteínicas**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Biologia, do Instituto de Ciências Biológicas, da Universidade Federal de Goiás como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Biologia.

Orientadora: Prof^ª. Dr^ª. Kátia Flávia Fernandes

Goiânia
2010

Adriane Guimarães Gambôa

Utilização do inibidor de papaína extraído de sementes de *Adenanthera pavonina* L. na purificação de proteases cisteínicas

BANCA EXAMINADORA

Presidente: Orientador: Prof^a. Dr^a. Kátia Flávia Fernandes

1° Examinador: Prof. Dr. Cirano José Ulhoa (UFG)

2° Examinador: Prof. Dr. Flávio Marques Lopes (Anhanguera Educacional)

Suplentes

1° Examinador: Prof. Dr. Roberto da Nascimento (UFG)

2° Examinador: Prof. Dr. Ivan Torres Nicolau de Campos (UFG)

Goiânia

2010

Nenhum problema pode ser resolvido pelo mesmo estado de espírito que o criou. É preciso ir mais longe. Eu penso 99 vezes e nada descubro. Deixo de pensar, mergulho num grande silêncio e a verdade me é revelada.

Albert Einstein

AGRADECIMENTOS

À Prof^ª. Dr^ª. Kátia Flávia Fernandes, pela orientação, apoio e paciência durante o desenvolvimento deste trabalho de mestrado.

Aos professores membros da Banca de Qualificação, Prof^ª. Dr^ª. Célia Maria de Almeida Soares e Prof^ª Dr^ª. Elisângela de Paula S. Lacerda, pela avaliação, que muito contribuiu para a finalização deste trabalho.

Aos professores da Banca de Defesa, Prof. Dr. Flávio Marques Lopes e Prof. Dr. Cirano José Ulhoa, pelas análises e importantes contribuições a este mestrado.

Aos meus pais, Paulo e Eunice, pelo amor, apoio e estímulo, com os quais tudo se torna mais fácil.

Aos meus filhos e esposo, pelo amor e carinho em todas as horas.

Aos meus amigos do coração Barbara Dumas, Aline França, Eduardo Fernandes e Martina Freire (nossa querida “baianinha”), pelo incentivo, apoio e por compartilharem momentos de muita alegria que jamais vou esquecer.

A todos do Laboratório de Enzimologia, por me receberem muito bem e pela disposição em me ajudar.

E acima de tudo, meu grandioso agradecimento a **DEUS!**

Lista de Figuras

Figura 1. Classificação das proteases segundo o tipo de reação catalisada -----	14
Figura 2. Estrutura da papaína-----	16
Figura 3. Mecanismo catalítico das cisteíno proteases -----	17
Figura 4. <i>A. pavonina</i> -----	22
Figura 5. Métodos de imobilização-----	24
Figura 6. Estrutura básica da polianilina-----	26
Figura 7. Esquema da extração dos inibidores de <i>A. pavonina</i> até a obtenção de F 30-60	32
Figura 8. Esquema da imobilização do inibidor de papaína em PANIG -----	35
Figura 9. Cromatograma de F 30-60 em Sephadex G-75 -----	38
Figura 10. SDS-PAGE 12%. Inibidores de <i>A. pavonina</i> -----	39
Figura 11. Inibição da atividade da papaína de acordo com a quantidade do inibidor de <i>A. pavonina</i> -----	41
Figura 12. PANIG sintetizada no LQP-----	43
Figura 13. Influência da quantidade de PANIG na imobilização do inibidor de <i>A. pavonina</i> -----	44
Figura 14. Influência do tempo na imobilização do inibidor de <i>A. pavonina</i> -----	45
Figura 15. Influência do pH na imobilização do inibidor de <i>A. pavonina</i> -----	46
Figura 16. SDS-PAGE 12% Papaína-----	47
Figura 17. SDS-PAGE 12% Bromelaína -----	49
Figura 18. SDS-PAGE 12% Ficina-----	50
Figura 19 - SDS-PAGE análise da bromelaína extraída do caule pelo método de extração micelar reverso -----	51

Lista de Tabelas

Tabela 1. Família de inibidores de proteases de plantas -----	19
Tabela 2. Classificação das técnicas de cromatografia líquida de acordo com a característica físico-química que é explorada das proteínas -----	25
Tabela 3. Trabalhos desenvolvidos no Laboratório de Química de Proteínas (LQP-UFG) utilizando polianilina (PANI) como suporte para imobilização de enzimas -----	27
Tabela 4. Purificação dos inibidores de papaína de <i>A. pavonina</i> -----	37
Tabela 5. Retenção do inibidor (I) em PANIG -----	46
Tabela 6. Purificação de bromelaína e ficina em PANIG-I -----	50

Resumo

No presente trabalho um inibidor de papaína extraído de sementes de *A. pavonina* foi imobilizado por ligação covalente em polianilina (PANI) modificada com glutaraldeído (PANIG), visando a aplicação desse material como fase estacionária para cromatografia de afinidade e sua aplicação na purificação das proteases cisteínicas bromelaína e ficina. A extração e purificação dos inibidores de *A. pavonina* resultou num rendimento de 3,9% no último passo de purificação. A cromatografia de gel filtração em resina Sephadex G-75 como passo para purificação dos inibidores resultou em três picos protéicos (F1, F2 e F3) dos quais F1 foi utilizado nos experimentos de imobilização por ter apresentado atividade específica mais alta. A imobilização foi feita utilizando-se PANIG. Para otimização das condições de imobilização foram variados na reação a quantidade de PANIG (5, 10 e 15mg), tempo (30, 60 e 90 min) e pH (5,0 a 8,0). As melhores condições para imobilização dos inibidores de *A. pavonina*, de acordo com os ensaios realizados, foram 5mg de PANIG, tempo de reação de 30min e pH 7,0. PANIG-I foi utilizada como fase estacionária de bioafinidade para separação de bromelaína e ficina. Eletroforese (SDS-PAGE) após o processo de separação revelou a presença de uma única banda, tanto para bromelaína como para ficina, de 28 e 25 kDa, respectivamente. Nesse processo, a ficina foi purificada 2,60 vezes e a bromelaína 0,89 vezes, mostrando que o uso dos inibidores de *A. pavonina* imobilizados em PANIG foram eficientes na purificação de proteases cisteínicas

Palavras-chave: *A. pavonina*, polianilina, proteases cisteínicas

Abstract

In this work papain inhibitor from *A. pavonina* was immobilized by covalent bond in polyaniline (PANI) modified with glutaraldehyde (PANIG) for be used as stationary phase for affinity chromatography and then applied in the purification of cysteine proteases bromelain and ficin. The extraction and purification of inhibitors protease from *A. pavonina* resulted in a yield of 3.9% in the last step of purification. Gel filtration chromatography performed in *Sephadex G-75* resin as a purification step resulted in three protein peaks (F1, F2 and F3), but only F1 was used in the experiments of immobilization because of higher specific activity. Immobilization was performed using PANIG. To optimize the immobilization conditions the amount of PANIG in the reaction (5, 10 and 15mg), time (30, 60 and 90 min) and pH (5.0 to 8.0) were varied. The best conditions for immobilization of *A. pavonina* inhibitor, according to tests performed were 5mg PANIG, reaction time of 30min and pH 7.0. PANIG-I was used as bio-affinity stationary phase for separation of bromelain and ficin. Electrophoresis (SDS-PAGE) performed after the separation process revealed the presence of a single band for both bromelain and ficina, with 28 and 25 kDa, respectively. In this process, ficin was purified 2,60 fold and bromelain 0,89 fold, showing that the use of inhibitors of *A. pavonina* immobilized in PANIG were efficient in the purification of cysteine proteases.

Keywords: *A. pavonina*, polyaniline, cysteine proteases

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	13
1.1 Proteases	13
1.1.1 Cisteíno proteases	16
1.2 Inibidores de proteases	19
1.2.1 Cistatinas	21
1.2.1.1 Fitocistatinas	21
1.3 A espécie <i>Adenanthera pavonina</i> L.	22
1.4 Imobilização de proteínas e cromatografia de afinidade	23
2 OBJETIVOS	29
2.1 Geral	29
2.2 Específicos	29
3 METODOLOGIA	30
3.1 Sementes de <i>A. pavonina</i>	30
3.2 Extração dos inibidores das sementes de <i>A. pavonina</i>	30
3.3 Determinação de proteínas totais de <i>A. pavonina</i>	31
3.4 Determinação da atividade inibitória	31
3.5 Fracionamento do extrato bruto aquecido com sulfato de amônio	32
3.6 Estudo da fração 30-60 (F 30-60)	32
3.6.1 Cromatografia de F 30-60 em Sephadex G-75	32
3.7 Preparação do suporte para imobilização do inibidor de <i>A. pavonina</i>	32
3.7.1 Síntese de polianilina	32
3.7.2 Ativação da polianilina com glutaraldeído	34
3.8 Imobilização do inibidor de papaína em PANIG	34
3.9 Capacidade de retenção reversível da papaína	35
3.10 Preparo dos extratos brutos de bromelaína e ficina	36
3.10.1 Bromelaína	36
3.10.2 Ficina	36
3.11 Cromatografia de afinidade para purificação de bromelaína e ficina	36
3.12 Eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE)	37
3.13 Testes estatísticos	37

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	38
4.1 Purificação do inibidor de papaína de <i>A. pavonina</i>	38
4.2 Síntese e ativação da polianilina	40
4.3 Imobilização de F1 em PANIG	42
4.3.1 Avaliação da capacidade de inibição	42
4.3.2 Efeito da quantidade de PANIG na imobilização	43
4.3.3 Efeito do tempo na imobilização	44
4.3.4 Efeito do pH na imobilização	45
4.3.5 Melhores condições para o ensaio de imobilização dos inibidores de <i>A. pavonina</i> em PANIG.....	46
4.4 Capacidade de retenção de papaína e cromatografia de afinidade.....	47
4.5 Cromatografia de afinidade utilizando PANIG-I para purificação de bromelaína e ficina	48
5 CONCLUSÕES.....	53
ANEXOS	61
Anexo 1. Análises Estatísticas (ANOVA e Teste Tukey).....	61

1 INTRODUÇÃO

O conhecimento acumulado pelo estudo de enzimas tem crescido numa proporção muito grande, e esse é um dos principais motivos para os avanços na área de enzimologia (LEE e HUANG, 2008). O interesse industrial pelas enzimas tem aumentado muito com o desenvolvimento da tecnologia enzimática, que tem como intuito maximizar as vantagens da biocatálise e minimizar suas desvantagens, a fim de permitir o uso de enzimas nos processos em larga escala (BOUCHOLZ *et al.*, 2006.).

Dentre as enzimas usualmente empregadas em indústrias, destacam-se as hidrolases, com ênfase para carboidrases, proteases e lipases. As proteases permanecem com uso predominante nas indústrias de detergentes e em laticínios, visto que o custo de purificação, mesmo que parcial, tem impedido seu uso em outros processos de larga escala como os das indústrias de fármacos, cosméticos, têxteis e de alimentos (SILVA, 2000; KIRK *et al.*, 2002).

Desse modo, a engenharia de enzimas para uso biológico e em reatores industriais se torna uma meta cada vez mais promissora. Felizmente, existem muitas técnicas disponíveis que permitem melhorar as características de uma enzima, envolvendo muitas áreas da ciência que sofreram impressionante evolução nos últimos anos: a microbiologia, a engenharia de proteínas, química de proteínas, dentre outras. No entanto, algumas técnicas cujo uso já data de épocas mais antigas, como a imobilização, foram redescobertas nos últimos tempos como um instrumento poderoso para melhorar quase todas as propriedades de uma enzima como, por exemplo, estabilidade, atividade, especificidade, seletividade e redução da inibição (MATEO *et al.*, 2007).

1.1 Proteases

As proteases são classificadas de acordo com a Enzyme Commission of International Union of Biochemistry and Molecular Biology - IUBMB - dentro do grupo 3 (hidrolases), subgrupo 4, sendo assim denominadas EC 3.4. Elas podem ser classificadas com base em três critérios: (1) tipo de reação catalisada, (2) natureza química do sítio catalítico e (3) relação evolutiva de acordo com a estrutura (BARRETT, 1994).

Proteases compõem um dos mais amplos e importantes grupos de enzimas. São consideradas enzimas ubíquas (realizam uma variedade de funções essenciais para todos os organismos) (BARRETT, 1987). São enzimas com atividade proteolítica, ou seja, hidrolisam, ou clivam ligações peptídicas (LAGO *et al.*, 2009). No entanto, a atividade das proteases não pode ser confinada somente ao catabolismo, já que essas enzimas também participam, de forma relevante, nos processos de síntese de citocinas e ferormônios (THORNBERRY *et al.*, 1992). A atividade proteolítica é essencial para o desempenho de muitos processos celulares, mas também pode estar envolvida em processos patológicos devido à atividade enzimática desregulada (BARRETT, 1987; CAMPBELL, 2005).

Em animais, as proteases atuam em processos que incluem a digestão de proteínas, coagulação sanguínea, controle do fluxo sanguíneo, lise celular na resposta imune e renovação de proteínas celulares. Nas plantas, as proteases participam dos processos de liberação de aminoácidos nos órgãos de reserva, na regulação da apoptose, fotossíntese, expressão gênica e defesa da planta contra pragas e patógenos (XAVIER-FILHO, 1993; SOLOMON *et al.*, 1999; ADAM, 2000; ESTELLE, 2001).

As proteases clivam seus substratos em sítios específicos (CAMPBELL, 2005). Assim, de acordo com relação ao tipo de reação catalisada, as proteases podem ser divididas em endopeptidases, quando clivam ligações peptídicas internas e exopeptidases, quando clivam ligações N-terminais ou C-terminais, liberando um único resíduo, um dipeptídeo ou um tripeptídeo. As endopeptidases também são denominadas proteinases (BARRETT, 1994; GOMES, 2004) (**Figura 1**).

De acordo com seus resíduos catalíticos, as proteases são divididas em seis classes principais: as aspartil proteases, serino proteases, treonino proteases, cisteíno proteases, glutamil proteases e metalo proteases (RAWLINGS *et al.*, 2006). As serino, cisteíno e treonino proteases possuem aminoácidos fortemente nucleofílicos em seu sítio catalítico. O mecanismo de ação destas enzimas é a catálise covalente, que envolve a formação de um intermediário covalente entre a enzima e o substrato. Já na catálise das aspartil, glutamil e metalo proteases, não ocorre ataque nucleofílico por um grupo funcional da enzima, sendo o nucleófilo nesse caso, uma molécula de água, não havendo, portanto, a formação de um intermediário covalente (catálise ácido-base). Neste tipo de catálise, um resíduo de ácido aspártico ou ácido glutâmico e o zinco, atuam como ácidos e bases (BARRETT *et al.*, 2004; RAWLINGS *et al.*, 2006).

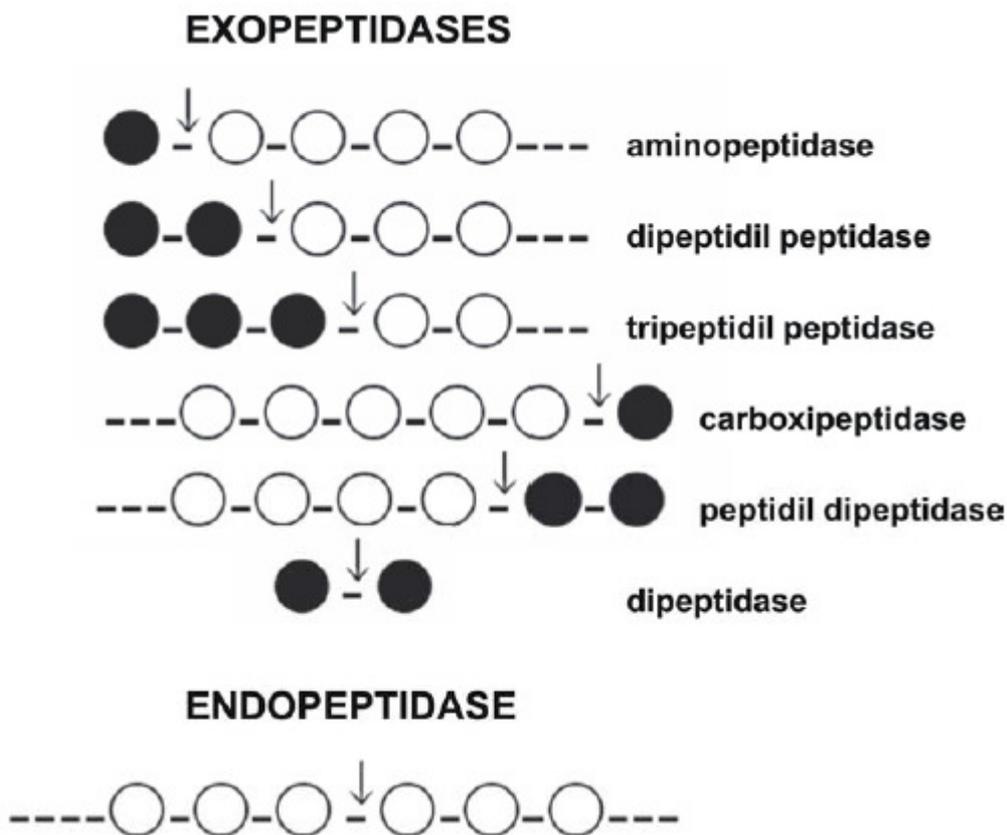


Figura 1. Classificação das proteases segundo o tipo de reação catalisada. ○ resíduos de aminoácidos; ● resíduos de aminoácidos liberados após a proteólise (GIANOTTI, 2008).

A classe das serino proteases compreende duas famílias distintas, a família da quimiotripsina que inclui enzimas de mamíferos como tripsina, quimiotripsina e elastase, e a família da subtilisina que inclui enzimas bacterianas, como a subtilisina. Embora as estruturas tridimensionais características dessas duas famílias sejam distintas, a geometria do sítio ativo de ambas é semelhante e a catálise ocorre por meio do mesmo mecanismo. Três resíduos de aminoácidos formam uma tríade catalítica essencial para a atividade da enzima: um resíduo de serina (nucleófilo), um resíduo de histidina (base doadora de prótons) e um resíduo de ácido aspártico (orientador da histidina) (BARRETT *et al.*, 2004).

A maioria das aspartil proteases pertence à família pepsina, a qual inclui enzimas digestivas como a pepsina e a quimiotripsina, a catepsina D lisossomal, e algumas proteases de fungos. Uma segunda família compreende as proteases virais, como a protease do vírus HIV. Essas enzimas são moléculas bilobadas, em que cada lobo possui um resíduo

de ácido aspártico, formando uma díade catalítica no sítio localizado entre os dois lobos (BARRETT *et al.*, 2004).

As metalo proteases são enzimas encontradas desde bactérias e fungos até organismos superiores. A atividade catalítica dessas enzimas depende da ligação de um metal, geralmente o zinco em seu sítio ativo (BARRETT *et al.*, 2004).

As treonino e as glutamil proteases não haviam sido descritas até 1995 e 2004, respectivamente. As treonino proteases são caracterizadas pela presença de um resíduo de treonina em seu sítio ativo, o qual possui um nucleófilo (grupo hidroxila) e a base (grupo amino). Os membros dessa classe de enzimas constituem as subunidades catalíticas do proteossomo, o qual está envolvido no *turnover* intracelular de proteínas. Essas proteases são encontradas em vírus, bactérias, fungos, plantas e animais (BARRETT *et al.*, 2004; RAWLINGS *et al.*, 2006).

Previamente classificadas como aspartil proteases, as glutamil proteases foram reclassificadas como um sexto tipo catalítico de proteases. A distribuição dessas enzimas é limitada aos fungos filamentosos, sendo o único tipo de proteases não encontrado em mamíferos. A atividade proteolítica dos membros dessa classe depende de uma díade catalítica que consiste dos resíduos ácido glutâmico e glutamina, os quais ativam a água nucleofílica e estabilizam o intermediário tetraédrico, respectivamente, durante a catálise (BARRETT *et al.*, 2004; RAWLINGS *et al.*, 2006).

1.1.1 Cisteíno proteases

As cisteíno proteases compreendem um complexo grupo, de variadas propriedades físicas e bioquímicas. Estão distribuídas em 44 famílias, classificadas de acordo com as relações evolucionárias e de similaridade estrutural e podem ser encontradas em bactérias, fungos, protozoários, plantas e mamíferos (GRZONKA *et al.*, 2001; BARRETT *et al.*, 2004; CAMPBELL, 2005; RAWLINGS *et al.*, 2006).

Em plantas, estas moléculas representam um grupo enzimático com propriedades similares, tais como peso molecular entre 20 e 30 kDa e pH ótimo entre 3,5 e 8,0 (GRZONKA *et al.*, 2001). As cisteíno proteases já foram isoladas de sementes de girassol, frutos de mamão (papaína) (EC 3.4.22.2), figo (ficina) (EC 3.4.22.3) e de abacaxi (bromelaína) (EC 3.4.22.4) (SEGUNDO, 1993). Geralmente essas enzimas são

encontradas nos vacúolos e são responsáveis pela mobilização de proteínas estocadas no endosperma durante a germinação das sementes (ARAI *et al.*, 2002); elas também são encontradas no meio extracelular, tais como aquelas de mamão e figo (RAWLINGS e BARRETT, 1994).

A papaína, extraída do látex de *Carica papaya*, foi a primeira enzima da família a ter sua estrutura tridimensional determinada por cristalografia de raios-X e hoje é o membro mais estudado da família (MONTI *et al.*, 2000). Algumas enzimas com características semelhantes às enzimas dessa família são descritas como “*papain-like*” (do tipo papaína). A estrutura tridimensional da papaína apresenta dois domínios separados por uma fenda, onde se encontra o sítio ativo. O domínio N-terminal consiste principalmente de α -hélices, enquanto o domínio C-terminal contém uma estrutura em barril- β . Os resíduos catalíticos são: Cys25, His159 e Asp175 (GRZONKA *et al.*, 2001; RAWLINGS *et al.*, 2006) (**Figura 2**).

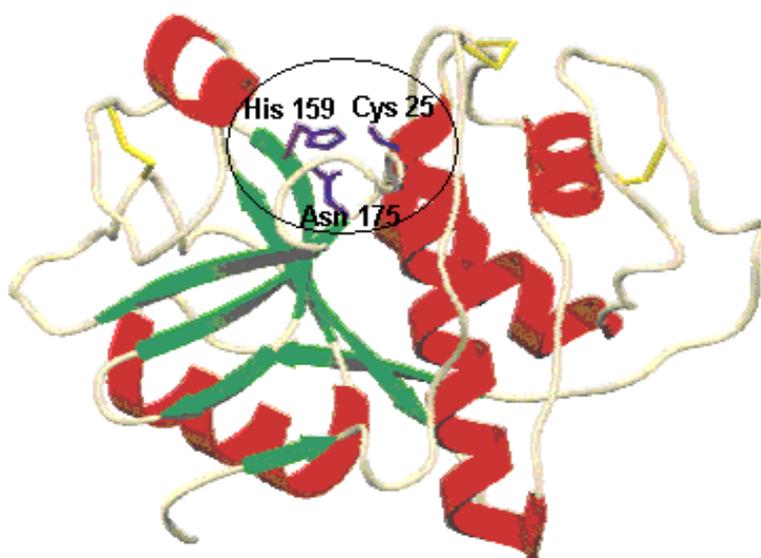


Figura 2. Estrutura da papaína (GRZONKA *et al.*, 2001).

O mecanismo catalítico das cisteíno proteases é caracterizado pela formação de um intermediário tetraédrico covalente, a acil-enzima, resultante do ataque nucleofílico do grupo tiol da cisteína do sítio ativo (Cys25) sobre a carbonila da ligação peptídica que será hidrolisada. O grupo imidazol da cadeia lateral da histidina (His159) atua comoceptor de hidrogênio na catálise. A asparagina (Asn175) orienta o anel imidazólico da histidina. O ataque nucleofílico do grupo tiol da cisteína sobre o carbono da carbonila da ligação

peptídica a ser hidrolisada gera um intermediário tetraédrico covalente entre a enzima e o substrato. Por uma reação de acilação, a porção C-terminal do substrato é liberada, deixando a enzima acilada. Em seguida, em uma reação de deacilação, a acil-enzima reage com uma molécula de água liberando a parte N-terminal do substrato e a enzima se regenera (STORER e MÉNARD, 1994; BARRETT *et al.*, 2004) (**Figura 3**).

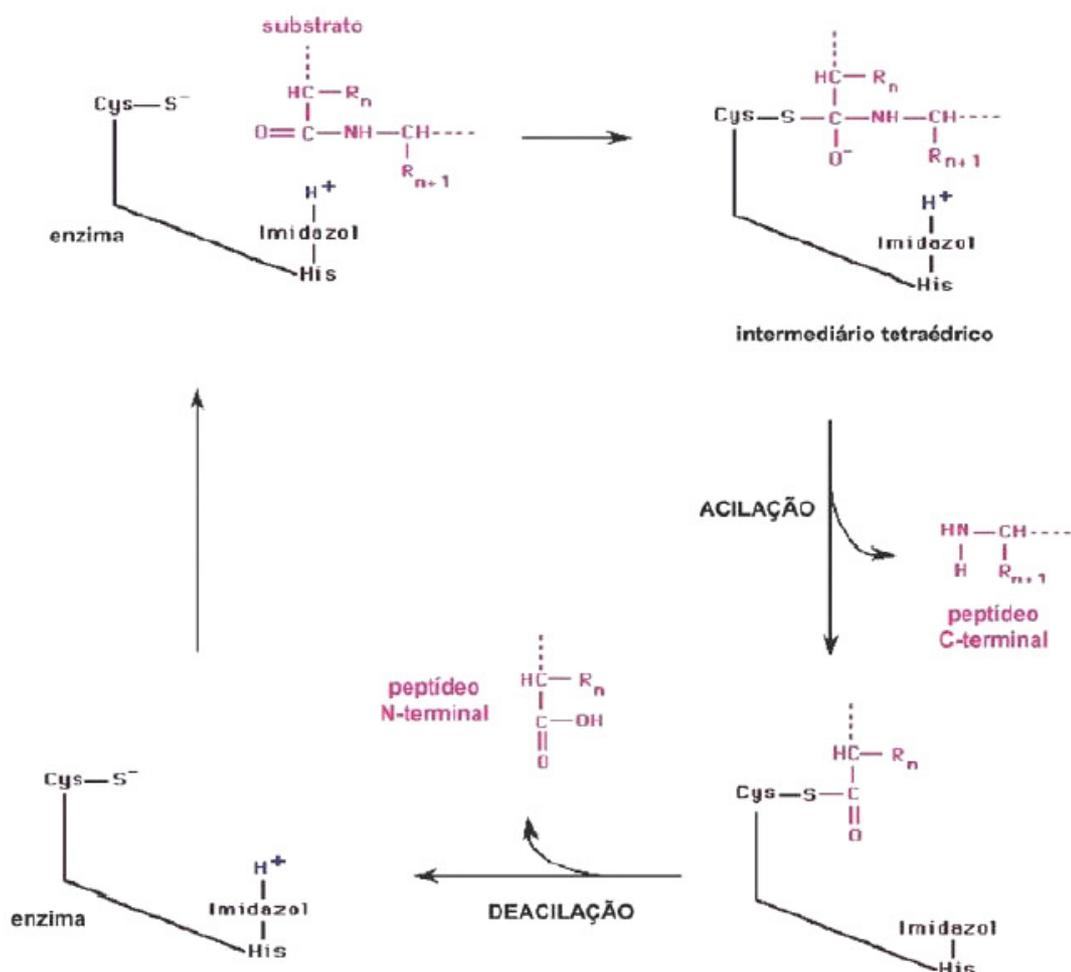


Figura 3. Mecanismo catalítico das cisteíno proteases (MENDONÇA, 2008).

De modo geral, a regulação da atividade das enzimas proteolíticas ocorre por meio de proteínas inibidoras de proteases. Os inibidores de protease são proteínas ou peptídeos que compreendem um grupo específico de moléculas que têm a propriedade de produzir um complexo estequiométrico com uma protease, sendo assim, capazes de inibir a atividade catalítica de enzimas proteolíticas (VALUEVA e MOSOLV, 1999).

1.2 Inibidores de proteases

Inibidores de proteases (IP) são moléculas que têm a capacidade de inibir a ação de enzimas proteolíticas. Esses inibidores formam um complexo estável com proteases alvo, bloqueando ou alterando o acesso ao sítio ativo da proteína (MACEDO *et al.*, 2007). Eles estão presentes na maior parte dos organismos vivos e desempenham diversas funções, como a regulação da proteólise de enzimas endógenas e exógenas.

A investigação do possível papel dos inibidores de proteases nos mecanismos de proteção de plantas iniciou em 1947, quando foi observado que larvas de certos insetos não se desenvolviam em produtos de sementes de soja e, mais tarde, que inibidores de tripsina presentes na soja mostraram-se tóxicos a outros insetos (LAWRENCE e KOUNDAL, 2002). Hoje, a busca por inibidores de proteases, vem recebendo atenção especial na tentativa de elucidar questões relacionadas à estrutura, papel fisiológico, mecanismo de ação, evolução e principalmente, o envolvimento nos mecanismos de defesa das plantas (GOMES, 2004).

Os inibidores de proteases são particularmente abundantes (1-10% das proteínas totais) e podem atuar, por exemplo, reduzindo os danos causados por insetos, no armazenamento protéico em sementes e tubérculos, na regulação da atividade proteolítica endógena e nos mecanismos de apoptose (XAVIER-FILHO, 1992; RYAN, 1991; SOLOMON *et al.*, 1999; USSUF *et al.*, 2001; LAWRENCE e KOUNDAL, 2002). Além disso, inibidores de proteases estão envolvidos na resposta ao estresse causado por fatores abióticos e nos processos de defesa de plantas e ataque de insetos. Trabalhos de Solomon *et al.* (1999) e Franco e Melo (2000) mostram q esses inibidores ligam-se especificamente às proteases presentes no trato digestivo dos insetos, diminuindo a assimilação de nutrientes, causando retardo no desenvolvimento e aumento da taxa de mortalidade.

O alto teor dos inibidores de proteases nas sementes de muitas espécies de plantas tem despertado o interesse quanto a sua função fisiológica, sugerindo atuação no armazenamento de nutrientes, ação protetora contra ataque de animais predadores, insetos e ainda no controle fisiológico das enzimas proteolíticas durante a dormência e a germinação, prevenindo a hidrólise prematura do material de reserva, controlando assim, a mobilização de proteínas durante estes períodos (LOPES, 2006).

Os inibidores de proteases da família *Fabaceae* são os mais bem estudados, devido a excelência reconhecida desta família como fonte de proteínas. Estudos recentes citam

diversos trabalhos sobre inibidores de proteases extraídos e purificados de leguminosas, pois o interesse está centrado no amplo espectro de atuação desses compostos em diversos processos fisiológicos, como as cistatinas, aplicadas como antitumorais e em doenças inflamatórias (OLIVEIRA *et al.*, 2003; LOPES, 2006).

Em animais, os inibidores de proteases podem impedir os eventos de proteólise indesejados, regulando diversas proteases *in vivo*. Inibidores de proteases têm sido utilizados como agentes terapêuticos, em particular, em eventos de transformação celular e de coagulação sanguínea, tratamento de osteoporose, doenças retrovirais e de câncer. Tendo em vista as diversas aplicações dos inibidores de proteases, principalmente na indústria farmacêutica e agrícola, a busca por novos inibidores de proteases tem despertado um grande interesse (GIANOTTI, 2008).

Baseado em evidências homológicas na estrutura primária, localização das pontes dissulfeto e posição dos sítios catalíticos, os inibidores de proteases de plantas têm sido agrupados em famílias distintas. Estas famílias podem diferir em peso molecular, conteúdo de pontes dissulfeto, estrutura tridimensional e agentes que causem desnaturação (MACEDO *et al.*, 2007) (**Tabela 1**).

Tabela 1. Família de inibidores de proteases de plantas (Modificado de MIGLIOLO, 2008).

Proteases	Classe	Família de Inibidores
Serínicas	Inibidores de proteases serínicas	Bowman-Birk Kunitz Batata I Batata II Superfamília de Cereais Taumatina Ragi I-2/milho
Cisteínicas	Inibidores de proteases cisteínicas	Cistatinas (Fitocistatinas em plantas)
Aspárticas	Inibidores de proteases aspárticas	Inibidores de proteases aspárticas
Metallo-proteinases	Inibidores de metallo-proteinases	Inibidores de carboxipeptidases A e B

1.2.1 Cistatinas

Cistatina é o nome dado às proteínas inibidoras de proteases cisteínicas. O nome cistatina foi originalmente dado por Barrett (1987) a um inibidor de proteases cisteínicas do tipo papaína, isolado da clara do ovo de galinha. Desde então, essa tem sido a nomenclatura usada para esses inibidores. Assim, os inibidores de proteases cisteínicas foram agrupados em uma superfamília, a das cistatinas, uma vez que a determinação da sequência de aminoácidos e das propriedades bioquímicas desses inibidores têm mostrado relações, em níveis de estrutura e função, com o inibidor isolado da clara de ovo de galinha. A maioria das proteases que é inibida pelas cistatinas pertence à família da papaína. Essas proteases apresentam um peso molecular de aproximadamente 25 kDa e grande homologia com a papaína (VIDAL, 2003).

As cistatinas são inibidores reversíveis de cisteíno proteases e seu mecanismo de ação é baseado na inibição competitiva através do bloqueio da atividade proteolítica (ABRAHAMSON, 1993). A manutenção do equilíbrio entre cisteíno proteases livres e em complexo com seus inibidores é crítico para o perfeito funcionamento de um sistema biológico (GRZONKA *et al.*, 2001).

A superfamília das cistatinas se divide em três famílias: (i) família das estefinas (família I), que os inibidores são desprovidos de pontes dissulfeto em sua estrutura e apresentam peso molecular aproximado de 11 kDa; (ii) família das cistatinas (família II), cujos representantes apresentam peso molecular de aproximadamente 13 kDa e contêm dois “*loops*” de pontes dissulfeto próximos à extremidades carboxílica; e (iii) família dos cininogênios (família III), cujos inibidores apresentam peso molecular acima de 40 kDa e seis “*loops*” de pontes dissulfeto, claramente resultante de duplicações do material genético da família cistatina. Todas as cistatinas contêm uma sequência conservada G-V-V-A-G, que provavelmente envolve a formação de um complexo enzimático (BARRETT, 1987).

1.2.1.1 Fitocistatinas

Cistatinas de plantas, também chamadas fitocistatinas, têm sido identificadas em estudos com várias espécies vegetais, como arroz, batata, milho, soja, feijão, repolho e cenoura (OLIVEIRA *et al.*, 2002). As fitocistatinas constituem a segunda maior classe de inibidores identificados e estudados e estão envolvidas na regulação da atividade das

proteases endógenas durante a maturação das sementes, e na defesa contra cisteíno proteases exógenas de insetos e nematóides (ARAI *et al.*, 2002). São proteínas que especificamente inibem a atividade da papaína e cisteíno proteases semelhantes, como a bromelaína e a ficina. As cisteíno proteases apresentam uma sequência consenso exclusiva para fitocistatinas, L-A-R-[FY]-A-[VI]-X(3)-N, formando uma α -hélice na região N-terminal, o que justifica sua inclusão em uma família própria (MARGIS *et al.*, 1998).

Plantas expressando inibidores desse tipo apresentaram excelentes resultados em estudos realizados por Oliveira *et al.* (2003) sobre o ataque de insetos. Isso, provavelmente pelo fato de que a maioria dos insetos possui essas proteases em seu sistema digestivo.

1.3 A espécie *Adenanthera pavonina* L.

A espécie arbórea *Adenanthera pavonina* L., pertencente à família *Fabaceae* e subfamília *Mimosoideae*, é nativa da Ásia Tropical, sendo popularmente conhecida no Brasil como olho-de-dragão, tento e carolina e encontrada em todo o cerrado e litoral brasileiro (FONSECA e PEREZ, 2003). Por apresentar crescimento rápido, conforme citado por Fanti (1997), essa espécie serve como bom dossel para plantas herbáceas, arbustivas e trepadeiras que não toleram altas intensidades luminosas. O cerne vermelho desta árvore é usado como um substituto da madeira do sândalo vermelho (*Pterocarpus sandalinus* L.), sendo assim, importante fonte fornecedora de madeira de boa qualidade para construções. Além de ser utilizada em reflorestamentos, como planta ornamental e como forrageira na Tailândia, o cozimento das sementes e da madeira permite o seu uso no tratamento de infecções pulmonares, podendo também o produto ser aplicado externamente no tratamento da oftalmia crônica (FANTI, 1997).

É uma árvore semidecídua, de 15-20 metros de altura e o tronco caracteriza-se por possuir uma casca parda e lisa enquanto que a ramagem é longa e esparsa formando copa aberta. As inflorescências de pedúnculos longos, axilares ou terminais, em racemos curtos, com flores amarelas são formadas principalmente nos meses de março a abril. Os frutos são vagens estreitas, achatadas, marrons, espiraladas quando se abrem, expondo as sementes globosas, achatadas, duras, vermelho-brilhantes. As sementes apresentam o tamanho médio de 10x12mm, e podem variar de tonalidade, tamanho e formato (FONSECA e PEREZ, 2003) (**Figura 4**).

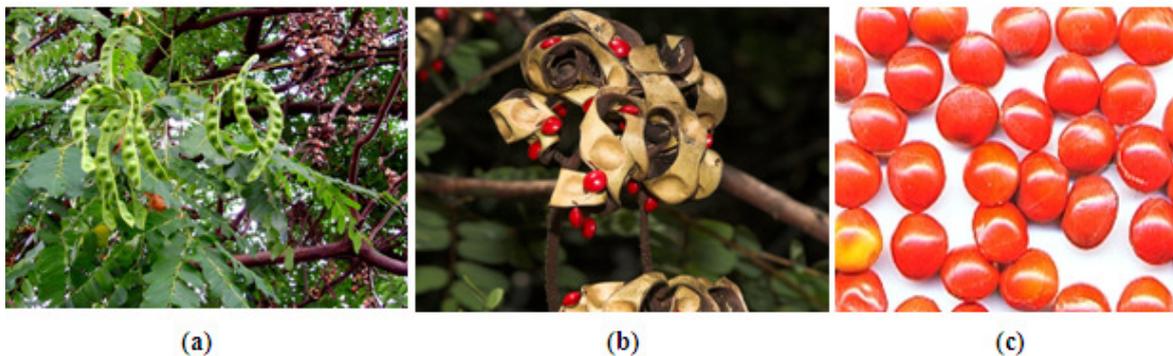


Figura 4. *A. pavonina*. (a) vagem verde; (b) vagem madura; (c) sementes.

Xavier-Filho (1992) destaca que *A. pavonina* contém três classes de inibidores de papaína: uma classe de baixo peso molecular (5 a 12 kDa); uma classe intermediária (20 a 30 kDa) e uma classe de alto peso molecular (60 a 80 kDa) que aparentemente estão universalmente presentes em plantas. Silva *et al.* (1995) em seu trabalho sobre inibidores de cisteína proteases de *A. pavonina* encontrou, após purificação desses inibidores a partir das sementes, inibidores de massa molecular aproximada de 29 kDa e cuja composição de aminoácidos era: glicina (18,45%), glutamato (16,60%), serina (12,54%), alanina (9,22%) aspartato (7,38%), prolina (6,64%), tirosina, valina e leucina (4,79%), arginina e isoleucina (3,32%) e histidina e lisina (1,84%), não tendo sido identificados resíduos de fenilalanina.

1.4 Imobilização de proteínas e cromatografia de afinidade

O presidente do Estado de Israel, professor e pesquisador Epharaim Katchalski-Katzir foi uma das figuras iniciais da história do desenvolvimento da imobilização de proteínas (BOHAK e SHARON, 1967).

Durante algumas décadas, polímeros hidrofílicos com capacidade de formar géis tiveram um papel dominante no desenvolvimento de métodos para o fracionamento de biomoléculas, sendo aplicados a processos de separação, como cromatografia e eletroforese (BOHAK e SHARON, 1967).

Atualmente, vários materiais incorporaram-se às matrizes de imobilização, os suportes granulares, ou em partículas, como a sílica e polianilina (PANI) (MATEO *et al.*, 2007).

A imobilização de proteínas sobre superfícies sólidas permite sua utilização em dispositivos biotecnológicos como biossensores, e seu estudo envolve aspectos físico-químicos fundamentais a respeito da interação entre as moléculas e as superfícies. A imobilização em um suporte pode dar-se por efeitos hidrofóbicos, interações eletrostáticas, ligações de hidrogênio e covalente. Por isso, na maioria dos casos, o suporte deve ser previamente modificado para favorecer as interações desejadas (CASTRO, 2008).

O grande desafio da imobilização é obter um suporte que favoreça a imobilização da proteína na melhor conformação possível, de forma que suas características permaneçam inalteradas. Isto feito, a imobilização apresenta como vantagens a facilidade de manutenção do suporte, possibilitando sua reutilização e seu armazenamento por longos períodos (CASTRO, 2008).

Os métodos de imobilização de proteínas se baseiam em princípios simples, como tamanho das moléculas, carga elétrica, ou características hidrofílico-hidrofóbicas. O estudo da imobilização de proteínas possui um amplo espectro de possibilidades, já que devido à complexidade das biomoléculas, não existe apenas um método de imobilização, nem tampouco um único suporte que seja excelente para todas as aplicações (SILVA, 2000).

Para imobilização de enzimas, por exemplo, há vários meios de se classificar os métodos utilizados. de Bickerstaff, (1997) propôs uma classificação que combina a natureza da interação responsável pela imobilização com a natureza do suporte utilizado (**Figura 5**).

Um grande número de diferentes suportes tem sido usado para imobilização, com matrizes apresentando características que vão desde hidrofílicas a hidrofóbicas (LEE e HUANG, 2008). De um modo geral, classificando-os de acordo com sua natureza química, podemos descrever duas classes: suportes orgânicos e inorgânicos (SILVA, 2000).

Os suportes orgânicos têm como principal vantagem sua versatilidade, por participarem em um grande número de diferentes reações, o que favorece sua ativação. (SILVA, 2000).

Os suportes inorgânicos têm a sílica e vidros de poros controlados como seus principais representantes. Sua característica mais promissora se deve à possibilidade de obtenção de materiais com propriedades morfológicas variadas, tais como diâmetros do poro, área superficial e forma das partículas, somadas às propriedades mecânicas.

Particularmente, a baixa compressibilidade, tornou tais suportes os elementos de escolha para montagem de reatores para aplicação industrial (KENNEDY e WHITE, 1987).

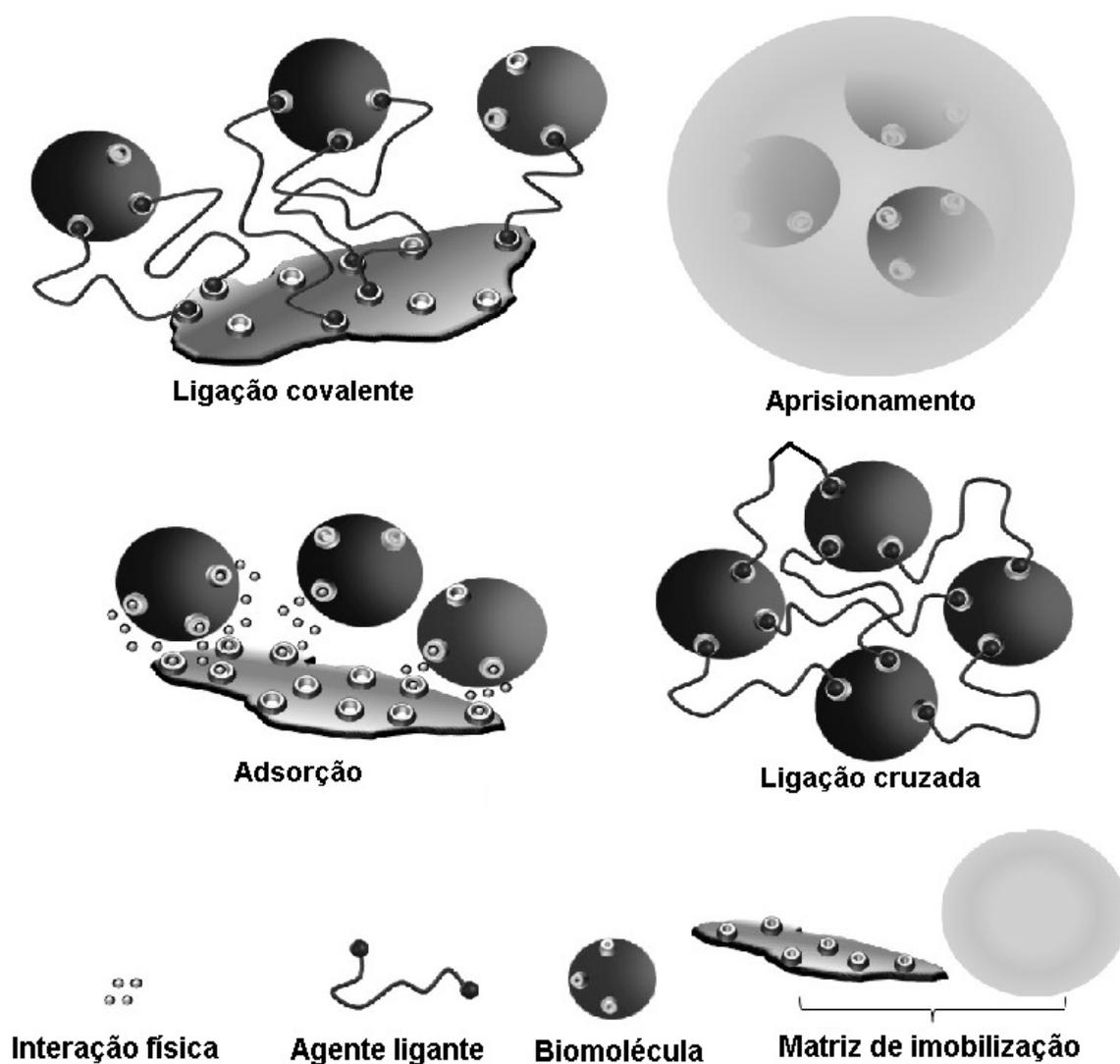


Figura 5. Métodos de imobilização (adaptado de Bickerstaff, 1997).

Dentre os vários tipos de cromatografia (**Tabela 2**), vários autores têm definido cromatografia de afinidade como um método baseado em interações moleculares específicas e reversíveis entre substâncias ativas biologicamente (MOHR e POMMERENING, 1986).

Há várias classes de ligantes para a cromatografia de afinidade e muitas aplicações. Na enzimologia, por exemplo, são usados como ligantes, as enzimas, substratos e seus

análogos, produtos, inibidores, efetores alostéricos, cofatores, anticorpos e substâncias sem função biológica. Em outro campo, a química de proteínas, são utilizados como ligantes hormônios, vitaminas, esteróides, lectinas, lipídios, anticorpos e polissacarídeos (MOHR e POMMERENING, 1986).

Tabela 2. Classificação das técnicas de cromatografia líquida de acordo com a característica físico-química que é explorada das proteínas. A condição inicial necessária para a realização da técnica, os eluentes mais comuns e as condições em que a solução de proteína ficará após sua eluição da coluna (modificado de ALMEIDA e KURTENBACH, 2002).

Tipo de cromatografia	Características da proteína	Condição inicial da amostra	Eluentes	Condição final da amostra
Gel filtração	Volume molecular	Volume da amostra <5% do volume da coluna	Qualquer solução aquosa	Amostra diluída em eluente
Troca iônica	Carga	Baixa concentração iônica	Soluções salinas ou com pHs distintos das condições iniciais	Amostra concentrada em solução salina
Interação hidrofóbica	Hidrofobicidade	Alta concentração de sal	Soluções com baixa concentração salina	Amostra concentrada em solução salina
Fase reversa	Hidrofobicidade	Não pode conter altas concentrações de sal	Solvente orgânico	Amostras sem sais em solventes voláteis
Afinidade	Especificidade à ligantes	Condições específicas para a ligação	Alta concentração de ligantes ou sais	Amostra concentrada, contendo ou não ligante

Um pré-requisito para a cromatografia de afinidade é a avaliação da matriz correta, que permitirá que substâncias sejam separadas ou purificadas. Uma variedade de suportes tem sido usada, com mais ou menos sucesso. A escolha correta de uma matriz e a ligação covalente entre matriz e ligante, pode ser essencial para o sucesso da cromatografia (MOHR e POMMERENING, 1986).

Muitos suportes poliméricos naturais e sintéticos têm sido usados em vários estudos de imobilização e cromatografia, incluindo polímeros de acrilamida, polivinileno carbonato, polianilina (PANI) e polietileno e nanocompostos de carbono (CARAMORI e FERNANDES, 2008).

Dentre os polímeros condutores, a PANI foi um dos primeiros a ser comercializado e hoje é um polímero presente nos mais variados dispositivos eletrônicos (TAHIR *et al.*,

2005). O termo polianilina refere-se a uma família ou classe de polímeros compostos de unidades repetidas de anilina (SILVA, 2000). A PANI na forma não dopada (base de esmeraldina) pode ser representada como na **Figura 6** (GALIANE *et al.*, 2007). Estes compostos apresentam alta versatilidade e detêm características únicas, tais como a simplicidade no processo de dopagem, excelente reciclabilidade redox e suas propriedades ópticas, elétricas e eletroquímicas (LEITE *et al.*, 1994; THANGARATHINAVELU *et al.*, 1994).

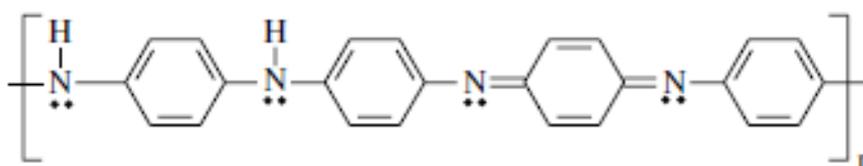


Figura 6. Estrutura básica da polianilina (GALIANE *et al.*, 2007).

O uso de polianilina para imobilização se justifica pelo fato de as partículas de polianilina apresentarem uma grande área de superfície na qual as enzimas podem ser imobilizadas e pelo fato de ser um polímero facilmente sintetizado, com grande estabilidade físico-química e grande capacidade de retenção (LEE *et al.*, 2008; PURCENA *et al.*, 2008). Além disso, a ausência de poros, combinada com a presença de grupos reativos na superfície do polímero, representam uma importante característica morfológica, que permite que o substrato se ligue ao sítio ativo da enzima imobilizada (PURCENA *et al.*, 2008).

O glutaraldeído, em função de suas propriedades bifuncionais, tem sido um dos reagentes mais utilizados nos métodos de imobilização. Esse composto liga-se covalentemente entre o suporte sólido e a enzima, formando um braço espaçador que confere à enzima maior mobilidade (OLIVEIRA e VIEIRA, 2006).

Os vários trabalhos realizados no LQP-UFG apontam a PANI, tanto em pó, como na forma de compósitos, como um excelente suporte para a imobilização (**Tabela 2**), já que suas propriedades se aproximam muito daquelas esperadas para um suporte ideal (alta capacidade de retenção, alta estabilidade, síntese simples e rápida e baixo custo). Além disso, este polímero apresenta alta estabilidade em extremos de pH e alta termoestabilidade, podendo suportar temperaturas de até 250° C antes que haja degradação do esqueleto carbônico (SILVA, 2000).

Além disso, a experiência com a purificação parcial de inibidores de papaína de *A. pavanina* levou-nos a propor neste trabalho a imobilização destes inibidores parcialmente purificados em PANI ativada com glutaraldeído (PANIG), visando a aplicação desse material como fase estacionária para cromatografia de afinidade e sua aplicação na purificação de proteases cisteínicas.

Tabela 3. Trabalhos desenvolvidos no Laboratório de Química de Proteínas (LQP-UFG) utilizando polianilina (PANI) como suporte para imobilização de enzimas (Modificado de PURCENA, 2008).

Título do trabalho	Autor(es)
Immobilization of horseradish peroxidase onto polyaniline polymers	FERNANDES <i>et al.</i> , 2003
Biossensor espectrofotométrico para determinação de glucose	LOPES, 2003
Properties of horseradish peroxidase immobilized onto polyaniline	FERNANDES <i>et al.</i> , 2004
Covalent immobilisation of horseradish peroxidase onto poly(ethylene terephthalate) - poly(aniline) composite	CARAMORI e FERNANDES, 2004
Immobilization of <i>Aspergillus niger</i> glucoamylase onto a polyaniline polymer	SILVA <i>et al.</i> , 2005
Imobilização de α -amilase de <i>Aspergillus niger</i> em polianilina	PASCOAL, 2005
Imobilização de enzimas em compósitos a base de polianilina	CARAMORI, 2007
Imobilização de lectinas em polianilina para remoção de lactose do soro de leite bovino	MACHADO, 2007
Imobilização de peroxidase em partículas de polianilina magnetizada e otimização de usos repetidos para construção de biossensor	BARBOSA, 2007
The use of poly(ethylene terephthalate) - poly(aniline) composite for trypsin immobilisation	CARAMORI e FERNANDES, 2008
Imobilização e caracterização de tripsina imobilizada covalentemente em polianilina	PURCENA, 2008
The immobilization of trypsin onto polyaniline for protein digestion	PURCENA <i>et al.</i> , 2009

2 OBJETIVOS

2.1 Geral

- Imobilizar o inibidor de papaína extraído de sementes de *A. pavonina* por ligação covalente em PANI ativada com glutaraldeído (PANIG);

2.2 Específicos

- Purificar parcialmente um inibidor de papaína de *A. pavonina*.
- Otimizar as condições de imobilização do inibidor quanto à quantidade de PANIG, tempo e pH;
- Testar a interação do inibidor imobilizado com a enzima papaína pura (Merck);
- Utilizar o inibidor imobilizado como fase estacionária para purificação das proteases cisteínicas bromelaína e ficina.

3 METODOLOGIA

3.1 Sementes de *A. pavonina*

As sementes de *A. pavonina* foram coletadas no *campus* da Universidade Federal do Ceará (UFC) e trazidas ao Laboratório de Química de Proteínas (LQP) da Universidade Federal de Goiás (UFG), onde o presente trabalho foi conduzido. No laboratório as sementes foram conservadas na geladeira a 4° C.

As sementes foram fragmentadas, com alicate, e separadas as cascas das amêndoas manualmente. Em seguida, a amêndoa foi triturada em liquidificador, e posteriormente passada por uma tamis (40 *mesh*), até se obter uma farinha fina com um peso final total de 763 g. A farinha foi armazenada em pote hermeticamente fechado, a temperatura ambiente, até a sua utilização.

Para delipidação da farinha, as 763 g do material triturado foram misturadas, sob agitação magnética, com hexano (1:1) durante 30 min. A mistura ficou em repouso *overnight*. Em seguida, descartou-se a fração lipídica. O material restante foi submetido à secagem em estufa com temperatura controlada de 37° C. O peso final da farinha delipidada e seca foi de 652 g.

3.2 Extração dos inibidores das sementes de *A. pavonina*

A extração dos inibidores foi feita de acordo com Silva (1991), usando a proporção de 1 g farinha para 10 mL de tampão fosfato de sódio 0,1 mol L⁻¹, NaCl 0,3 mol L⁻¹, pH 8,0. A mistura foi agitada continuamente durante 1 h e então centrifugada por 20 min, a 9 000 x g, a 4° C. Após centrifugação, o precipitado foi descartado e o sobrenadante resultante foi denominado de Extrato Bruto (E.B) e submetido imediatamente a aquecimento. Aliquotadas de 1 mL foram armazenadas em *freezer* para posterior dosagem de proteínas e inibidores.

O E.B foi aquecido a 90° C em banho-maria por 20 min e, em seguida, resfriado rapidamente em banho de gelo. A mistura obtida foi centrifugada por 20 min, a 9 000 x g, a 4° C. O precipitado foi descartado e o sobrenadante denominado Extrato Bruto aquecido (E.B.aq), utilizado como fonte de inibidores para os processos posteriores. A preparação do E.B e E.B.aq foi procedida seguindo o esquema mostrado na **Figura 7**.

Em seguida à obtenção do E.B.aq, esse foi submetido a fracionamento com sulfato de amônio, como segundo passo do processo de purificação dos inibidores de *A. pavonina* (item 3.5).

3.3 Determinação de proteínas totais de *A. pavonina*

A concentração de proteínas foi determinada pelo método de Bradford (1976), usando-se soro albumina bovina (BSA) como padrão. Para cada ensaio, foram utilizados 100 μL da amostra para 5,0 mL do reativo de Bradford, com um tempo de incubação de 10 min. Finalizado o tempo de reação fez-se a leitura em espectrofotômetro no comprimento de onda de 595 nm. Todos os ensaios foram realizados em triplicata.

Nos eluatos cromatográficos, a concentração de proteínas foi medida pela absorvância em 280 nm, as leituras foram zeradas com tampão fosfato 0,1 mol L⁻¹.

3.4 Determinação da atividade inibitória

A atividade inibitória das frações foi determinada segundo o método de Kunitz modificado por Arnon (1970): a uma alíquota de 450 μL de tampão Tris-HCl 0,05 mol L⁻¹, pH 8,0 foram acrescentados 200 μL de solução ativadora contendo EDTA 0,02 mol L⁻¹, cisteína 0,05 mol L⁻¹ preparada em tampão Tris-HCl 0,05 mol L⁻¹, pH 8,0 e, em seguida acrescentou-se 50 μL da solução de papaína na concentração de 0,5 mg mL⁻¹ (7,6 \pm 0,3 U). Posteriormente foram adicionados 300 μL de cada fração contendo os inibidores, ajustando o volume para 1,0 mL. A solução foi incubada por 10 min, a 37° C, em seguida adicionou-se de 1,0 mL de caseína 1% (p/v) preparada em tampão Tris 0,05 mol L⁻¹, pH 8,0. Passados 10 min, a reação foi interrompida pela adição de 3,0 mL de TCA 5% (p/v). Nos tubos relativos ao branco, a adição de TCA se deu antes da adição de caseína. As soluções foram centrifugadas a 9 000 x g, por 10 min, e o sobrenadante foi analisado em espectrofotômetro a 280 nm. Nos tubos para medida da atividade de papaína, o volume relativo aos inibidores foi substituído por tampão fosfato 0,1 mol L⁻¹. Todos os ensaios foram realizados em triplicata.

A atividade inibitória foi determinada por meio da comparação da atividade enzimática de solução de papaína contendo os inibidores com a atividade da solução de papaína sem os inibidores, seguindo método de Kunitz modificado por Arnon (1970). A

atividade inibitória foi expressa em unidades de inibidor (UI), conforme definição de Xavier-Filho (1977) “*uma unidade de inibidor de papaína (1 UI) foi definida como a quantidade de inibidor que diminui a absorvância em 0,1 a 280 nm nas condições de análise*”.

3.5 Fracionamento do extrato bruto aquecido com sulfato de amônio

O E.B.aq foi fracionado com sulfato de amônio nas faixas de 0-30% (F 0-30) e 30-60% (F 30-60) (**Figura 7**). Após agitação por 1 h, repouso em geladeira *overnight* e centrifugação a 9 000 x g por 20 min, cada fração precipitada foi dissolvida em água destilada e dialisada por 24 h, com troca de água a cada 2 h. Em seguida as frações foram liofilizadas e analisadas quanto à presença de inibidores de papaína e teor de proteína, conforme os **itens 3.3 e 3.4**.

3.6 Estudo da fração 30-60 (F 30-60)

3.6.1 Cromatografia de F 30-60 em Sephadex G-75

Uma coluna de *Sephadex G-75* medindo 2,3 x 60,0 cm foi equilibrada com tampão fosfato 0,1 mol L⁻¹, pH 7,0. 400 mg de F 30-60 contendo 98 mg de proteína foram dissolvidos em 6 mL do tampão de equilíbrio, centrifugados e o sobrenadante aplicado na coluna. A eluição se fez com o tampão de equilíbrio a uma vazão de 1,5 mL min⁻¹, durante 180 min, e a absorvância das frações medida a 280 nm. Após identificação dos picos contendo atividade inibitória (**item 3.5**), os tubos da fração com maior atividade inibitória (F1) foram reunidos, dialisados contra água destilada e liofilizados. Este material parcialmente purificado foi denominado Inibidor (I) e posteriormente utilizado para imobilização em PANIG.

3.7 Preparação do suporte para imobilização do inibidor de *A. pavanina*

3.7.1 Síntese de polianilina

O procedimento para a síntese de polianilina (PANI) seguiu a metodologia descrita por Pron *et al.* (1988), na qual adiciona-se uma solução de 0,68 mol L⁻¹ do agente oxidante

persulfato de amônio ((NH₄)₂S₂O₈) a uma solução 0,44 mol L⁻¹ de anilina (C₆H₅NH₂), ambas preparadas em HCl 2,0 mol L⁻¹.

A reação de polimerização foi processada pela adição (gota a gota) de solução de agente oxidante sobre a solução de anilina, com leve agitação, por um período mínimo de 2 h, mantendo-se a solução numa faixa de temperatura entre -5 e 5° C. Após a adição de agente oxidante a solução permaneceu sob agitação por 30 min, seguido por 2 h de repouso, finalizando a síntese. O precipitado foi separado por filtração a vácuo em funil de *Buchner* e então lavado com HCl 2,0 mol L⁻¹. O polímero foi seco em dessecador sob vácuo contínuo, à temperatura ambiente, até alcançar peso constante.

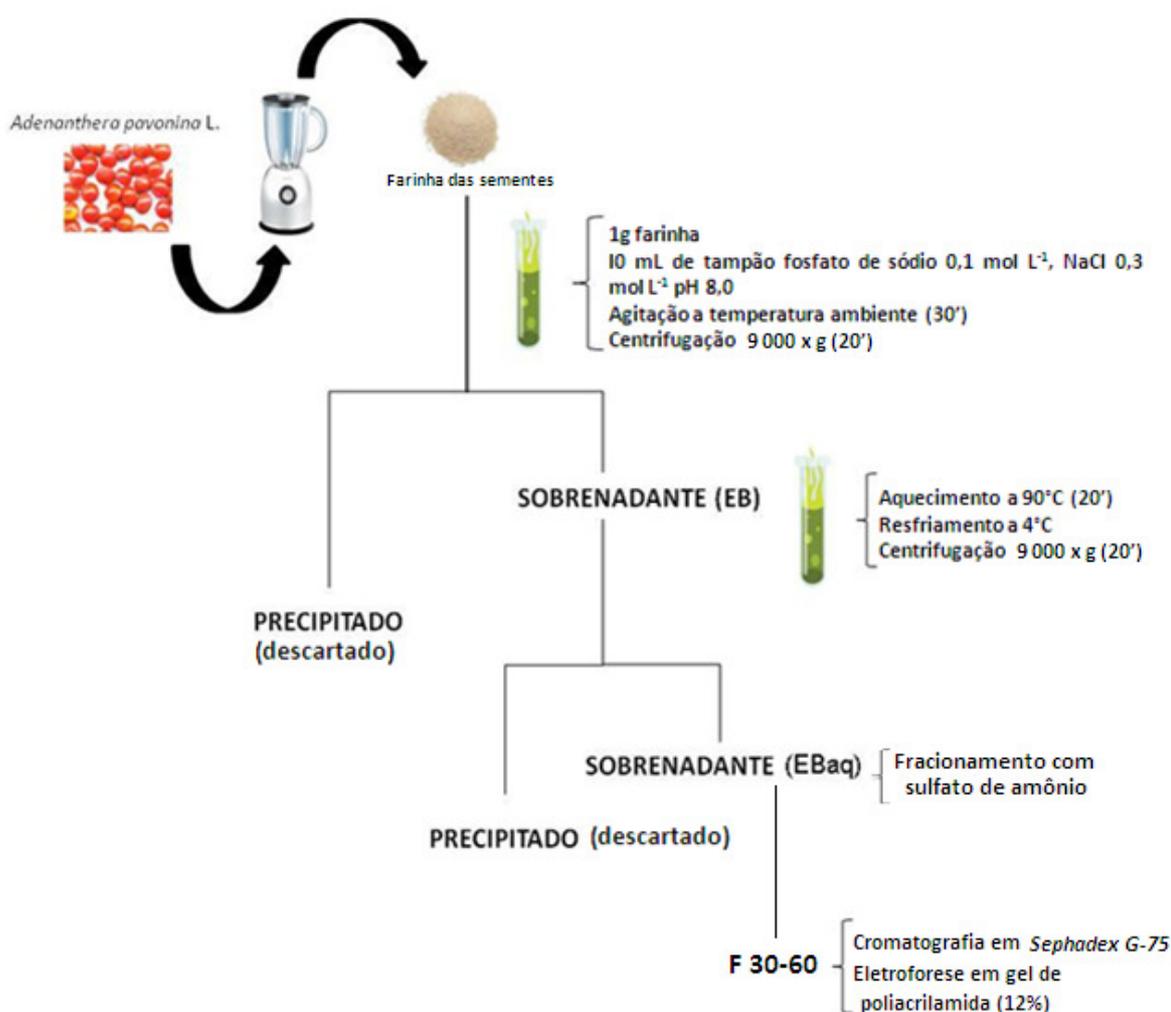


Figura 7. Esquema da extração dos inibidores de *A. pavonina* até a obtenção de F 30-60.

3.7.2 Ativação da polianilina com glutaraldeído

A ativação da polianilina foi realizada pela ligação de poliglutaraldeído segundo modificação da metodologia adotada por Fernandes (2003). Para ativação, uma solução de glutaraldeído 2,5% (v/v) preparada em tampão fosfato 0,1 mol L⁻¹, pH 7,0 foi misturada à PANI, na proporção de 10 mL de glutaraldeído para 1 mg de PANI. Colocou-se a suspensão em aquecimento por 2 h. A polianilina ativada com glutaraldeído (PANIG) foi lavada, em funil de *Buchner* com tampão fosfato 0,05 mol L⁻¹, pH 7,0 para retirar o excesso de glutaraldeído. O polímero (PANIG) foi seco em dessecador e armazenado em frasco de plástico opaco, ao abrigo da luz e em temperatura ambiente.

3.8 Imobilização do inibidor de papaína em PANIG

Inicialmente foram realizados testes para se estabelecer a quantidade de inibidor (I) necessária para se obter a completa inibição de 50 µL de solução de papaína pura (7,6 ± 0,3 U) (n° de produto 1071440025; 25g; hidrossolúvel 30.000U; solúvel a 20° C; valor de pH 4-7 - Merck). A imobilização foi conduzida com o objetivo de se obter as condições de máxima inibição. Para isso, foram variados a quantidade de inibidor (5 a 30 mg de I), o pH (5,0 a 8,0) e o tempo de reação de imobilização (30 a 90 min) (**Figura 8**). Os tampões utilizados nos ensaios de pH de imobilização foram acetato de sódio 0,1 mol L⁻¹ para pH 5,0 e fosfato de sódio 0,1 mol L⁻¹ para os demais pH.

Após otimização, foi realizado um ensaio de imobilização típico em que se adicionou a 5 mg de PANIG uma solução contendo 20 mg de inibidor preparado em 300 µL de tampão fosfato 0,05 mol L⁻¹, pH 8,0. A reação se deu por 30 min, a 4° C, sob agitação. Logo após o conteúdo foi transferido para tubos *ependorf* e centrifugado por 5 min e o sobrenadante retirado (S₀). A PANIG com o inibidor imobilizado (PANIG-I) foi lavada com tampão fosfato 0,1 mol L⁻¹, pH 7,0 três vezes e os sobrenadantes (S₁, S₂ e S₃) foram avaliados quanto à quantidade de proteína pelo método de Bradford (**item 3.4**) e inibidor (**item 3.5**).

A atividade do inibidor livre foi determinada adicionando-se a um tubo 50 µL de papaína pura (Merck), 200 µL de solução ativadora [EDTA 0,02 mol L⁻¹; cisteína 0,05 mol L⁻¹ em tampão Tris-HCl 0,05 mol L⁻¹, pH 8,0], 300 µL da solução do inibidor (6,6 ± 0,4UI) e 450 µL de tampão Tris-HCl 0,05 mol L⁻¹, pH 8,0.

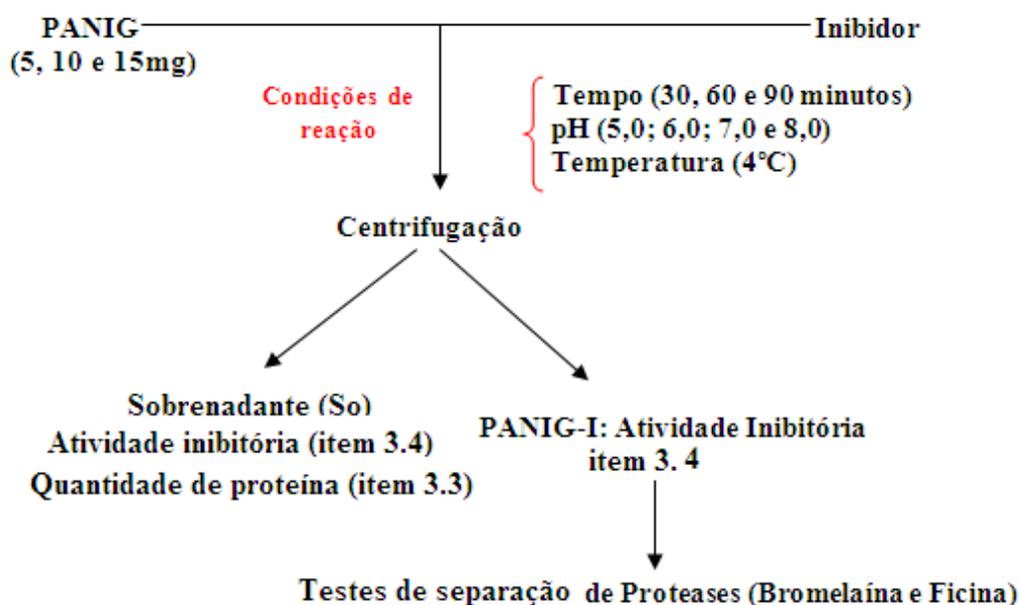


Figura 8. Esquema da imobilização do inibidor de papaína em PANIG.

3.9 Capacidade de retenção reversível da papaína

Foram realizados testes com PANIG-I para avaliar a capacidade de retenção da papaína pelo inibidor imobilizado.

No tubo contendo PANIG-I foi adicionado 1,0 mL de tampão Tris-HCl 0,05 mol L⁻¹, pH 8,0 contendo os ativadores e papaína como descrito no **item 3.8**. A mistura foi incubada por 10 min, a 37 °C e, centrifugada por 5min e lavada, três vezes, com tampão fosfato 0,1 mol L⁻¹ para remoção da papaína livre. Após esse processo o precipitado foi separado e passou a ser denominado PANIG-I-Pap e submetido em seguida ao teste de reversibilidade do processo. O sobrenadante foi testado quanto à quantidade de papaína e proteína remanescente.

A reversibilidade do processo foi testada por eluição da papaína, feita por alteração de pH e força iônica do meio com o uso de NaOH 0,1 mol L⁻¹. Aos 5 mg de PANIG-I-Pap, foram adicionados 1 mL de NaOH 0,1 mol L⁻¹, o conteúdo foi invertido manualmente por 30 seg, e em seguida foi adicionado HCl 0,1 mol L⁻¹ até atingir a neutralidade, a qual foi verificada com fita indicadora de pH. Após centrifugação, ao volume final do sobrenadante eluído foi adicionado acetona gelada, na proporção 1:3 e deixado em *freezer overnight* e centrifugado por 10 min a 4° C. O sobrenadante foi descartado e o precipitado foi

submetido à eletroforese para avaliação da purificação de papaína no inibidor imobilizado em PANIG.

Após os resultados obtidos com o uso de papaína, PANIG-I foi utilizada como fase estacionária para a purificação de bromelaína e ficina.

3.10 Preparo dos extratos brutos de bromelaína e ficina

3.10.1 Bromelaína

As amostras foram preparadas com abacaxi do “tipo pérola”, encontrado em mercado. Na extração de bromelaína, segundo César (2005), com modificações, o talo foi cortado em pedaços, macerado e o filtrado foi precipitado com acetona (1:3). Após evaporação da acetona, o material foi ressuspensionado em tampão fosfato de sódio $0,1 \text{ mol L}^{-1}$, pH 7,0. Este material foi submetido a ensaio de atividade proteolítica sobre a caseína, conforme feito para papaína (item 3.4) e alíquotas de 1,0 mL foram armazenadas em *freezer* a -20°C e utilizadas no processo de purificação.

3.10.2 Ficina

As amostras foram preparadas a partir do látex do figo, segundo Sgarbieri (1965). Para coletar o látex, os pedúnculos dos frutos verdes foram quebrados e o líquido leitoso foi coletado em tubos estéreis. Este material foi centrifugado a $9\,000 \times g$ por 20 min. A goma do látex, de cor branca, acumulada na parte superior do tubo foi separada cuidadosamente da parte inferior, que se constitui de um líquido claro amarelado. Este líquido foi armazenado em *freezer* a -20°C até o uso para ensaio de atividade, como para papaína e bromelaína, e cromatografia de afinidade, assim como para bromelaína. Alíquotas de 500 μL foram utilizadas no processo de purificação.

3.11 Cromatografia de afinidade para purificação de bromelaína e ficina

A PANIG-I foi utilizada como fase estacionária em cromatografia de afinidade para a separação de proteases cisteínicas presentes nos extratos brutos de bromelaína e ficina.

O processo de separação consistiu em adicionar a um becker de 10 mL, 200 mg de PANIG-I e 1,0 mL do extrato bruto de bromelaína (12,45 mg mL⁻¹) durante 10 min, a 37° C. Em seguida a mistura foi filtrada a vácuo em funil de *Büchner* utilizando papel Whatman n° 1. O sobrenadante foi armazenado para medida de proteínas de bromelaína pelo método de Bradford (1976), conforme **item 3.4**. A bromelaína retida na resina PANIG-I-Brm foi eluída conforme descrito para papaína pura (**item 3.8**). A amostra eluída foi testada para conteúdo de proteína e atividade enzimática e foi precipitada com acetona gelada (1:3). O precipitado foi utilizado na eletroforese para avaliação da purificação.

O processo de purificação da ficina seguiu o mesmo protocolo para bromelaína, utilizando-se 500 µL de solução de ficina (25,34 mg mL⁻¹).

3.12 Eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE)

Para avaliar o grau de purificação dos inibidores de *A. pavanina* e a eficiência do uso de PANIG-I na purificação das enzimas foram feitas eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) 12%.

As amostras precipitadas com acetona foram ressuspensas em tampão de amostra, fervidas em banho-maria e centrifugadas.

A corrida eletroforética foi realizada a uma amperagem de 45 mA, em tampão TRIS-glicina. Após corrida, as bandas foram detectadas no gel por meio de corante Coomassie Brilliant Blue R-250 ou nitrato de prata (AgNO₃). A visualização das imagens foi realizada em um fotodocumentador BIO-RAD, modelo Universal Hood II. Foram utilizados 20 µL dos marcadores Unstained Protein Molecular (SM 0431) (14,4-116 kDa) e Broad Range (P7708S) (7-175 kDa).

3.13 Testes estatísticos

Para análise estatística dos dados foi realizado o teste de ANOVA e a ele aplicado o teste de Tukey (p<0,05) pelo pacote estatístico do *Microsoft Office Excel*. Todas as análises dos dados estatísticos encontram-se no **Anexo I**.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Purificação do inibidor de papaína de *A. pavonina*

A partir dos volumes obtidos em cada passo do processo de purificação, de suas respectivas quantidades de proteínas e de unidades inibitórias (UI), foi construída uma tabela de purificação (**Tabela 3**). O grau de purificação dos inibidores de *A. pavonina* foi de 13,8 vezes, com um rendimento de 3,9% no último passo de purificação.

Tabela 4. Purificação dos inibidores de papaína de *A. pavonina*.

Material	Proteínas totais (mg)	Atividade inibitória* (UI g ⁻¹)	Atividade Específica (UI mg ⁻¹)	Purificação (x)	Rendimento (%)
EB	279,8	64	0,23	1	100
EBaq.	167,9	64	0,38	1,65	100
F 30-60	4,63	4,9	1,06	4,61	7,7
F1	0,78	2,48	3,18	13,8	3,9

O tratamento térmico do E.B revelou-se um procedimento eficiente no processo de purificação, além da facilidade e rapidez. O fracionamento por sulfato de amônio mostrou-se pouco eficiente na faixa de 0-30% como etapa de purificação, uma vez que poucas proteínas precipitaram na F 0-30. Os inibidores foram encontrados na faixa de 30-60%, tendo o processo resultado em uma purificação de 4,61 vezes.

A passagem dessa fração em coluna cromatográfica de gel filtração, com resina *Sephadex G-75*, resultou em seu fracionamento em três picos protéicos com atividade inibitória, sendo denominados F1, F2 e F3. Apenas a fração F1 (correspondente as tubos 82-98) foi separada e utilizada no processo de imobilização de inibidores, pois esse pico apresentou a maior quantidade de inibidores, de acordo com a leitura em espectrofotômetro a 280 nm e maior atividade específica (5,5 UI) (**Figura 9**). A purificação obtida pela passagem de F 30-60 na coluna cromatográfica foi de 13,80 vezes (**Tabela 3**).

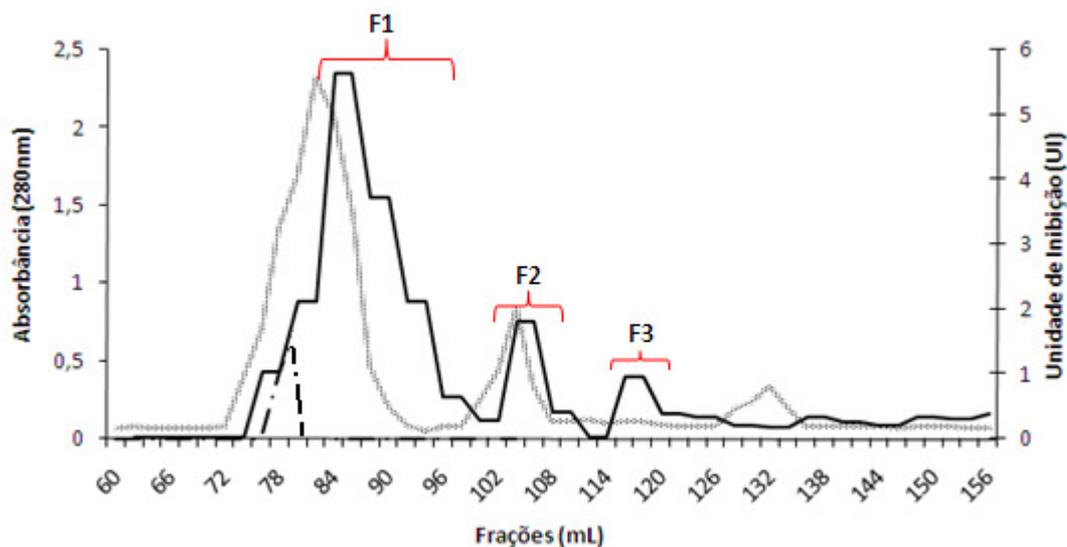


Figura 9. Cromatograma de F 30-60 em Sephadex G-75. Frações de 1,5mL foram coletadas e os tubos do intervalo de F1 foram reunidos e utilizados nos ensaios de imobilização. Absorbância a 280 nm (.....); Conteúdo de inibidores (—); Conteúdo de proteases (— · -).

A eletroforese (SDS-PAGE 12%) mostrou que F1 constituía-se de um inibidor de massa molecular aproximada 60 kDa após purificação dos inibidores de *A. pavonina* (**Figura 10**). Conforme dito anteriormente, Xavier-Filho (1992) destaca que *A. pavonina* contem três classes de inibidores de papaína: uma classe de baixo peso molecular (5 a 12 kDa); uma classe intermediária (20 a 30 kDa) e uma classe de alto peso molecular (60 a 80 kDa) que aparentemente estão universalmente presentes em plantas. A presença somente de inibidores de alto peso molecular, pode ser devido à presença de pontes dissulfeto, o que confere alta termoestabilidade às moléculas. Os inibidores de menor massa molecular, por terem conteúdo menor de pontes dissulfeto, provavelmente não resistiram ao processo de aquecimento.

Em 1988, Oliva *et al.*, em estudos de purificação de inibidores de sementes de *Enterolobium contortisiliquum*, também da subfamília *Mimosoideae*, conseguiram isolar um inibidor de papaína de 60 kDa pela purificação dos inibidores das favas de *E. contortisiliquum* por cromatografia de afinidade em resina carboxi-metil-Sepharose. Os estudos mostraram que o inibidor apresenta uma cadeia polipeptídica de 60 kDa e é capaz de inativar papaína e bromelaína. O inibidor apresentou atividade na faixa de pH que varia de 2 a 10 e temperaturas de até 60° C.

Na **Figura 10**, é possível observar que o E.B apresenta um arraste e uma banda forte de peptídeos abaixo de 20 kDa. Esse arraste se deve à hidrólise de proteínas por proteases presentes nesta fração. Dessas proteases, pelo menos uma mostrou-se resistente ao tratamento térmico recebido pelo E.B.aq, e aparece na cromatografia de Sephadex G-75 como um pico eluído entre as frações 76-81.

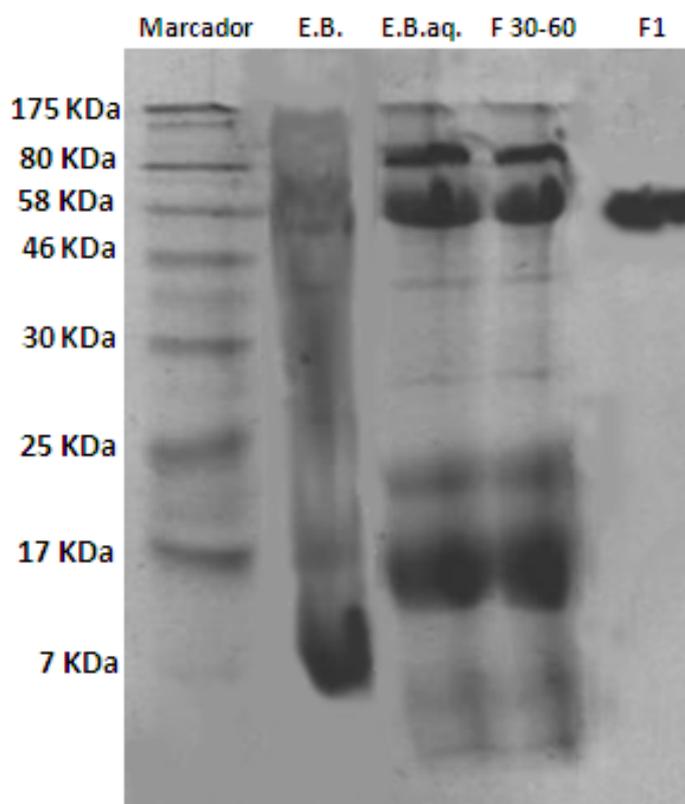


Figura 10. SDS-PAGE 12%. Inibidores de *A. pavonina*. Frações obtidas durante o processo de extração dos inibidores. O inibidor (60 kDa) foi purificado no último passo da extração, pela passagem de F-30-60 em coluna *Sephadex G-75*. **Coluna 1:** marcador Broad Range (P7708S) (7-175 kDa); **coluna 2:** extrato bruto (E.B); **coluna 3:** extrato bruto aquecido (E.B.aq); **coluna 4:** fração precipitada com sulfato de amônio 60% (F 30-60); **linha 5:** inibidor purificado (F1).

4.2 Síntese e ativação da polianilina

A síntese química de polianilina resultou em um material na forma de pó fino, de cor negro-esverdeada-brilhante, a denominada poliesmeraldina (PUD *et al.*, 2003). Após a ativação com glutaraldeído, as características físico-químicas do polímero foram alteradas, resultando em um pó de aspecto negro-opaco (**Figura 11a**). Este material analisado por microscopia de varredura apresenta um aspecto rugoso, com grande área superficial, como pode ser visto na **Figura 11b**.

A modificação de PANI com glutaraldeído foi feita com três objetivos: (i) a introdução de espaçadores para permitir a mobilidade dos inibidores imobilizados; (ii) reduzir as interações entre os inibidores e a matriz de PANI; e (iii) introduzir na superfície de PANI grupos carbonila capazes de reagir com grupos de aminoácidos dos inibidores de *A. pavonina*.

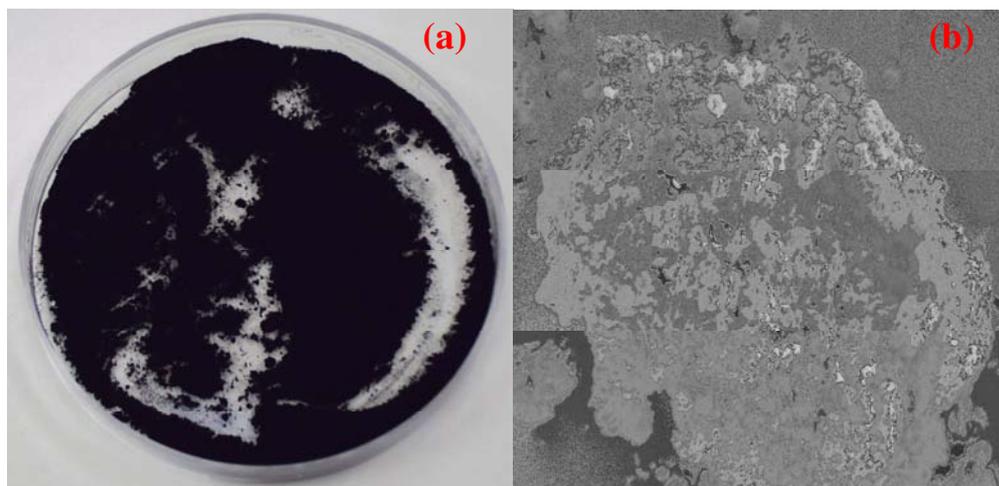


Figura 11. PANIG sintetizada no LQP. (a) Fotografia; (b) Microscopia eletrônica de varredura (MEV).

Alguns grupos de pesquisa mundiais utilizam a polianilina, em pó ou em fibras, em suas diversas formas – ativada, magnetizada, dentre outras –, como suporte para a imobilização de proteínas e enzimas. Na maioria dos casos, as enzimas imobilizadas, em comparação com as enzimas livres, apresentam uma boa atividade catalítica, estabilidade, resistência ao armazenamento e principalmente, tanto o suporte, quanto a enzima podem ser reutilizados.

Bayramoglu *et al.* (2009) utilizaram fibras de polianilina para imobilização reversível de invertase. Várias quantidades de polianilina foram testadas e de acordo com o aumento do conteúdo de PANI, aumentou-se a atividade da invertase imobilizada. A quantidade máxima de enzima imobilizada em fibras compostas contendo PANI 2,0% foi de 76,6 mg g⁻¹. O pH ótimo para a enzima livre foi observado em 5,0. Por outro lado, a invertase imobilizada rendeu um amplo perfil de pH ótimo entre pH 5,0 e 7,0. A invertase imobilizada apresentou 83% de sua atividade original mesmo após dois meses de armazenamento a 4° C, enquanto a enzima livre apresentou apenas 7% de sua atividade inicial. Lee *et al.* (2008), desenvolveram nanofibras de PANI ativadas magneticamente

para separação e recuperação de enzimas imobilizadas. Os testes foram realizados com lipase. As lipases covalentemente ligadas e agregadas, mantiveram um elevado grau de estabilidade e foram facilmente recuperadas a partir da solução enzimática, podendo ser usadas repetidamente. A atividade enzimática da foi mais de 80% da atividade da enzima livre, nas mesmas condições de temperatura e armazenamento por 32 dias.

No LQP, muitos trabalhos têm sido desenvolvidos com o uso de polianilina como suporte para imobilização. No Brasil, este é o único grupo atuando nessa linha de pesquisa. O uso de PANI como suporte iniciou-se com a imobilização de *Horseradish Peroxidase* (HRP). Em 2003, Fernandes *et al.*, ativaram PANI com glutaraldeído (PANIG) e HRP foi imobilizada com sucesso, mantendo 100% de sua atividade. A partir daí vários trabalhos foram desenvolvidos pelo grupo, com continuidade da imobilização de HRP, e imobilização de outras enzimas, como tripsina, invertase, lectina, glicocamilase e α -amilase.

A imobilização de inibidores de papaína em PANI/PANIG ainda não foi descrita na literatura e ainda, a imobilização dos inibidores de papaína de *A. pavanina* não foi descrita para nenhum suporte.

4.3 Imobilização de F1 em PANIG

4.3.1 Avaliação da capacidade de inibição

Nos testes para se avaliar a quantidade de inibidor necessária para inibir 100% de uma solução de 50 μ L de papaína ($7,6 \pm 0,3$ U), o máximo de inibição alcançada foi de 88 e 89,4% com o uso de 20 e 30 mg de inibidor, respectivamente (**Figura 12**). Com 5 e 10 mg de inibidor, a inibição obtida foi de 33,4 e 68,5%, respectivamente. A análise estatística por ANOVA, seguida de teste de Tukey ($p < 0,05$) revelaram que não há diferença estatística entre a inibição obtida pelo uso de 20 e 30 mg de inibidor. Assim, para os experimentos de imobilização foram usadas 20 mg de inibidor.

Os testes para estabelecer as melhores condições de imobilização envolveram a variação da quantidade de PANIG, tempo de pH de reação.

4.3.2 Efeito da quantidade de PANIG na imobilização

Os maiores valores de inibição foram alcançados com o uso de 5 e 10 mg de PANIG. No entanto, não há diferença estatisticamente significativa entre esses dois valores, o que justifica o uso de 5 mg de PANIG para imobilização dos inibidores de F1. O uso de 10 ou de 15 mg não se justifica, pois implicaria num gasto maior de PANIG com rendimento igual ou menor que o uso de 5 mg.

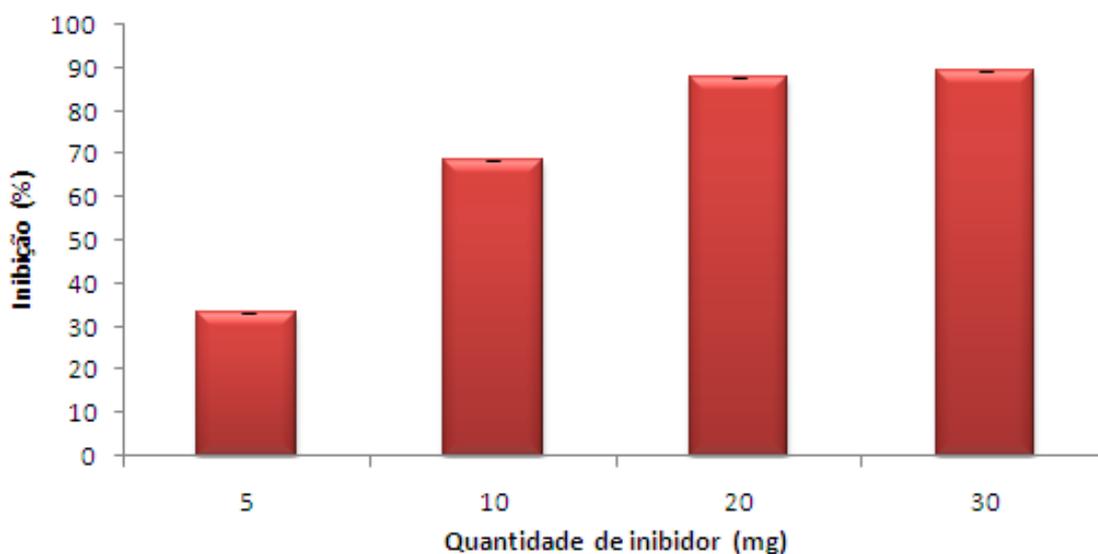


Figura 12. Inibição da atividade da papaína de acordo com a quantidade do inibidor de *A. pavonina*. O inibidor foi utilizado nas quantidades de 5, 10, 20 e 30mg a 37°C por 10min. A inibição foi testada com o uso de papaína pura (Merck).

Em 5 mg foram imobilizados 3,1 UI do inibidor, sendo que a análise de S_0 revelou 3,0 UI. Em 10 mg foram imobilizados 3,2 UI do inibidor, sendo que a análise de S_0 revelou 2,8 UI, Em 15 mg foram imobilizados 2,4 UI do inibidor, sendo que a análise de S_0 revelou 2,8 UI. A análise dos sobrenadantes quanto à quantidade de inibidores e proteínas que não foram imobilizadas mostrou que com o uso de 15 mg de PANIG houve uma maior perda de inibidor que havia sido aplicado na imobilização (2,8 UI em S_0). Dos sobrenadantes S_1 , S_2 e S_3 apenas na quantidade de 15 mg de PANIG foi detectado presença de inibidores em S_1 (0,65 UI) (**Figura 13**).

Apesar de os testes para avaliação da capacidade de inibição terem apontado para o uso de 20 mg de inibidor, correspondendo a uma inibição de 88%, os resultados obtidos

nos testes com relação à quantidade de PANIG sugerem que a quantidade de inibidor ofertada foi excessiva, tendo em vista que com o uso de 5 e 10 mg de PANIG, os valores para a quantidade de inibidor imobilizado e no sobrenadante foram bastante próximas, indicando uma saturação da matriz de imobilização. No entanto, esse fato apenas fere um dos princípios da imobilização, que é a redução de custos pela economia de material. Pois a inibição foi eficiente (88%) e quantidade de PANIG ideal é um valor baixo (5 mg).

Purcena *et al.* (2008) em seu trabalho sobre imobilização de tripsina em polianilina também encontrou que a quantidade de PANIG ideal era de 5 mg, com retenção de 11U de tripsina.

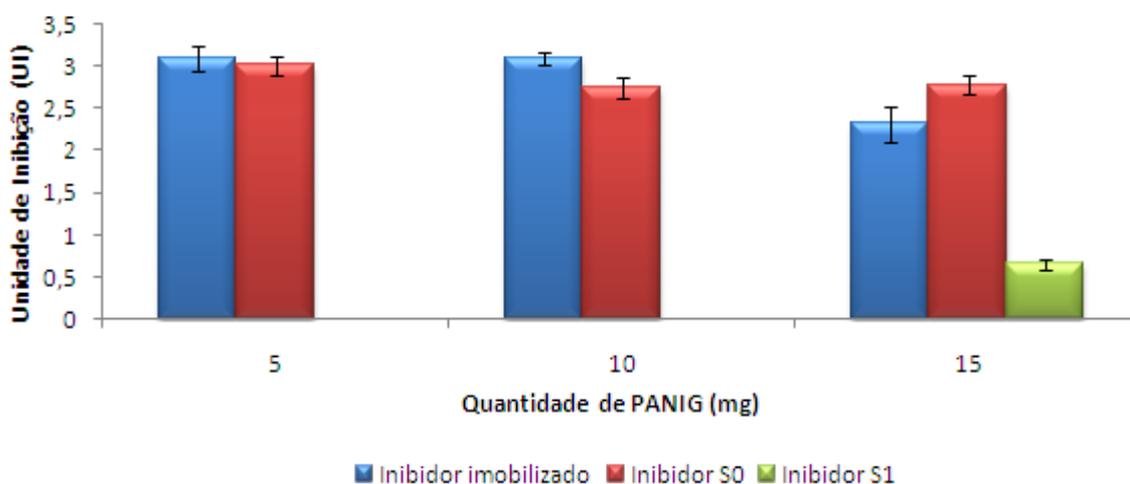


Figura 13. Influência da quantidade de PANIG na imobilização do inibidor de *A. pavonina*. Ensaio realizado a 4° C por 30 min com 5, 10 e 15 mg de PANIG e com 20 mg de inibidor.

Os melhores resultados foram obtidos com o uso de 5 mg de PANIG e esta quantidade foi utilizada nos testes posteriores (tempo e pH) para a otimização das condições de imobilização.

4.3.3 Efeito do tempo na imobilização

Para o tempo de imobilização, a análise estatística mostrou haver influência deste parâmetro na imobilização dos inibidores de *A. pavonina*, já que à medida que o tempo de imobilização foi aumentado, os valores de unidade de inibição (UI) diminuíram, provavelmente devido a formação de várias camadas dos inibidores, resultando em excessiva proximidade e assim impedindo a ligação da enzima papaína ao seu inibidor

Os maiores valores de inibição foram obtidos no tempo de 30 min. A partir de 30 min, os valores de unidade de inibição começam a decrescer. De todos os sobrenadantes analisados (S_0 , S_1 , S_2 e S_3), apenas o S_0 apresentou inibidores, 3,07 UI para 30 min, 2,16 UI para 60 min e 1,55 UI para 90 min (**Figura 14**). Assim como nos testes para avaliação do efeito da quantidade de PANIG na imobilização os valores de inibidor imobilizado e no sobrenadante (UI) estão muito próximos. Em 30 min ficaram retidos 3,1 UI, em 60 min, 2,3 UI. Em 90 min a quantidade de inibidor imobilizado (2,4 UI) foi maior que o valor encontrado no sobrenadante.

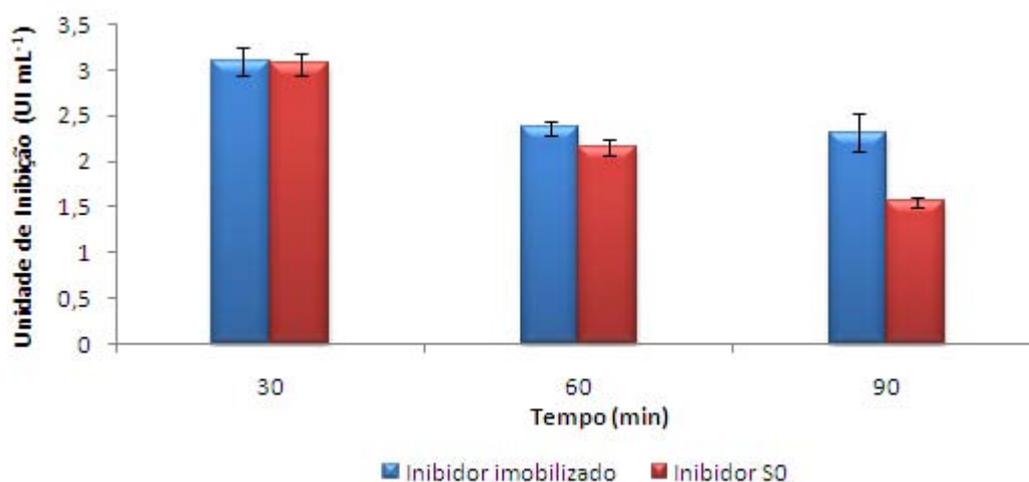


Figura 14. Influência do tempo na imobilização do inibidor de *A. pavanina*. Ensaio realizado a 4° C, com 5 mg de PANIG e 20 mg de inibidor por 30, 60 e 90 min.

Os melhores resultados foram obtidos em 30min de reação e este tempo foi utilizado no teste posterior (pH) para a otimização das condições de imobilização.

4.3.4 Efeito do pH na imobilização

O valor de pH relacionado aos maiores valores de inibição foi o pH 7,0 (**Figura 15**). Valores entre 5,0 e 7,0 foram verificados como ótimo para imobilização de diferentes enzimas em polianilina, como HRP e tripsina (CARAMORI et al., 2004; CARAMORI, 2007) Laska *et al.* (1999) também verificaram que se obtém uma maior imobilização de uréases em polianilina em pH 7,0.

Tal fato pode ser explicado pelo fato de que essas enzimas têm atuação em sistemas biológicos dos seres vivos, como é o caso das proteases, presentes no trato digestivo de insetos.

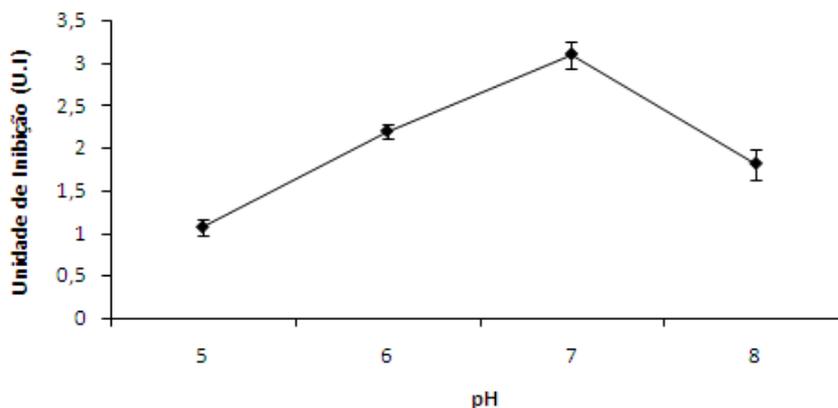


Figura 15. Influência do pH na imobilização do inibidor de *A. pavonina*. Ensaio realizado a 4°C por 30min, com 5mg de PANIG. Os melhores resultados foram obtidos em pH 7,0.

4.3.5 Melhores condições para o ensaio de imobilização dos inibidores de *A. pavonina* em PANIG

As melhores condições para imobilização dos inibidores de *A. pavonina*, de acordo com os ensaios realizados, foram 5 mg de PANIG, tempo de reação de 30 min e pH 7,0. Após otimização das condições de imobilização, papaína pura (Merck) foi utilizada para testar o ensaio de purificação de proteases, antes de se partir para os testes com bromelaína e ficina (**Tabela 4**).

Tabela 5. Retenção do inibidor (I) em PANIG.

Material	Quantidade de papaína (mg)	Quantidade de inibidor (UI)	Atividade específica (UI mg ⁻¹)	Imobilização (%)
F1	1,2	6,6	5,5	-
S _o	0,35	3,02	8,62	-
PANIG-I	0,85	3,58	4,21	54,24

A atividade específica do inibidor imobilizado em PANIG foi de 4,21 UI mg⁻¹ e a imobilização foi de 54,24%, ou seja, mais da metade do total de inibidores de ligou a PANIG (3,58 UI). A eficiência do processo, medida pela razão entre a atividade específica da solução ofertada para imobilização (F1) e a atividade específica do material imobilizado (PANIG-I) foi de 0,764. Isto significa que apenas cerca de 24% das moléculas de inibidor

imobilizadas não mantiveram sua atividade. A perda da atividade pode ser decorrente do processo de imobilização propriamente dito, que pode ter ocorrido de modo a obstruir o sítio de ligação à papaína. Outra possibilidade é a de que um número excessivo de moléculas de inibidor pode ter se imobilizado, resultando em impedimento espacial para a ligação da papaína ao inibidor.

4.4 Capacidade de retenção de papaína e cromatografia de afinidade

A fim de se avaliar se PANIG-I poderia atuar como fase estacionária para cromatografia de afinidade, foram feitos testes iniciais com uso de papaína pura (Merck). Após reação entre PANIG-I e papaína a amostra eluída foi avaliada por eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PGE 12%). Como pode ser visto na **Figura 16**, a eletroforese revelou uma única banda de aproximadamente 25 kDa na amostra eluída, na mesma altura da banda de papaína pura aplicada como controle. Este resultado revela ainda a estabilidade da ligação entre o inibidor e a PANIG que resistiu ao tratamento com NaOH seguido pela adição de HCl. Além disso, mostra a especificidade da interação entre inibidor e papaína.

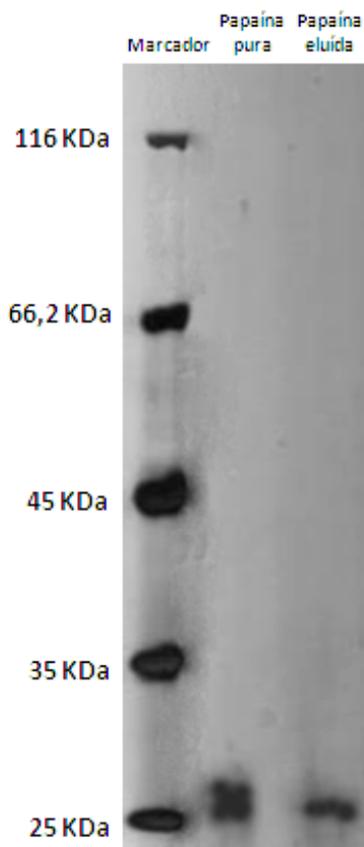


Figura 16. SDS-PAGE 12% Papaína. Gel corado com nitrato de prata. Na **coluna 1** foram adicionados 20 μ L do marcador Unstained Protein Molecular (SM 0431) (14,4-116 KDa). **Coluna 2:** papaína pura (controle); **coluna 3:** papaína eluída após purificação em PANIG-I.

4.5 Cromatografia de afinidade utilizando PANIG-I para purificação de bromelaína e ficina

Nos testes utilizando PANIG-I para isolamento de bromelaína e ficina a eficiência deste material como fase estacionária ficou comprovada conforme pode ser visto nas **Figuras 17 e 18**. Similar ao ocorrido com a papaína, o tratamento do extrato bruto dessas proteases com PANIG-I resultou na visualização de uma única banda para bromelaína e ficina eluídas.

No caso da bromelaína a eletroforese mostrou a presença de peptídeos formados provavelmente por autólise, similar ao que ocorre no E.B, pois a fração eluída foi armazenada em temperatura ambiente, que pode permitir esse processo (**Figura 17**). Murachi (1976) purificou a bromelaína do talo de abacaxi por cromatografia de gel-filtração, e determinou que a massa da fração era de 28 kDa por SDS-PAGE. Rowan *et al.* (1990) descreveram a presença de quatro proteases principais presentes em abacaxis:

bromelaina do fruto, bromelaina do talo, ananaína e comosaína. A **Figura 17** mostra que a fração eluída proveniente do processo de purificação em PANIG-I possui uma massa molecular de 28kDa.

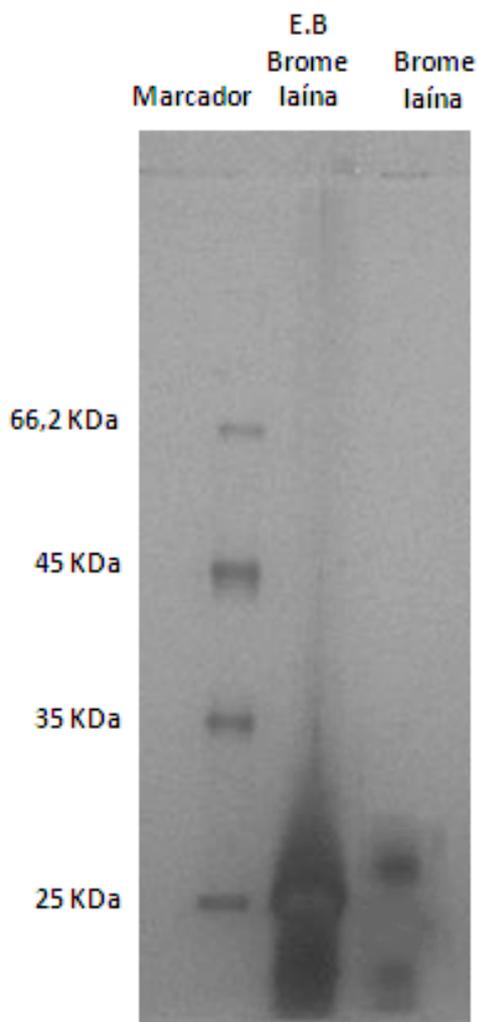


Figura 17. SDS-PAGE 12% Bromelaína. Gel corado com nitrato de prata. Na **coluna 1** foram adicionados 20 μ L do marcador Unstained Protein Molecular (SM 0431) (14,4-116 KDa). **Coluna 2:** extrato bruto de bromelaína; **coluna 3:** bromelaína eluída após purificação em PANIG-I.

Na eletroforese realizada para aplicação de PANIG com ficina (**Figura 18**) é possível identificar que o extrato bruto apresenta duas bandas bem destacadas com massas moleculares de 25 kDa e 28 kDa. Já na visualização da enzima eluída de PANIG-I apenas uma banda com 25 kDa pode ser vista, sendo esta provavelmente a ficina. Sugiura e Sasaki (1974) em seu trabalho sobre purificação de ficina a partir do látex do figo detectou em eletroforese (SDS-PAGE) massa molecular de 24 kDa a 26 kDa para esta cisteíno protease.

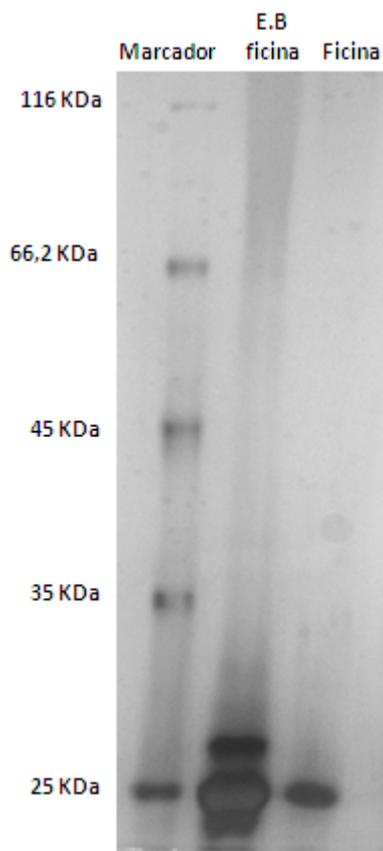


Figura 18. SDS-PAGE 12%. Ficina. Gel corado com nitrato de prata. Na **coluna 1** foram adicionados 20 μ L do marcador Unstained Protein Molecular (SM 0431) (14,4-116 KDa). **Coluna 2:** extrato bruto da ficina; **coluna 3:** ficina eluída após purificação em PANIG-I.

Hebbar *et al.* (2008) usaram um sistema micelar reverso para a extração e purificação de bromelaína do caule de abacaxi. O sistema micelar é uma técnica de extração baseada na separação de moléculas de acordo com a fase orgânica das mesmas (lipofílico-hidrofílica). É um método líquido-líquido. Nesse trabalho, após a extração e purificação do extrato bruto de abacaxi, a análise por eletroforese mostrou uma única banda de 26 kDa (**Figura 19**), valor semelhante aos resultados obtidos com a purificação pelo uso dos inibidores de *A. pavanina*. A purificação obtida pelo uso do sistema micelar variou de 1,7 a 2,1 vezes, de acordo com a fase aquosa.

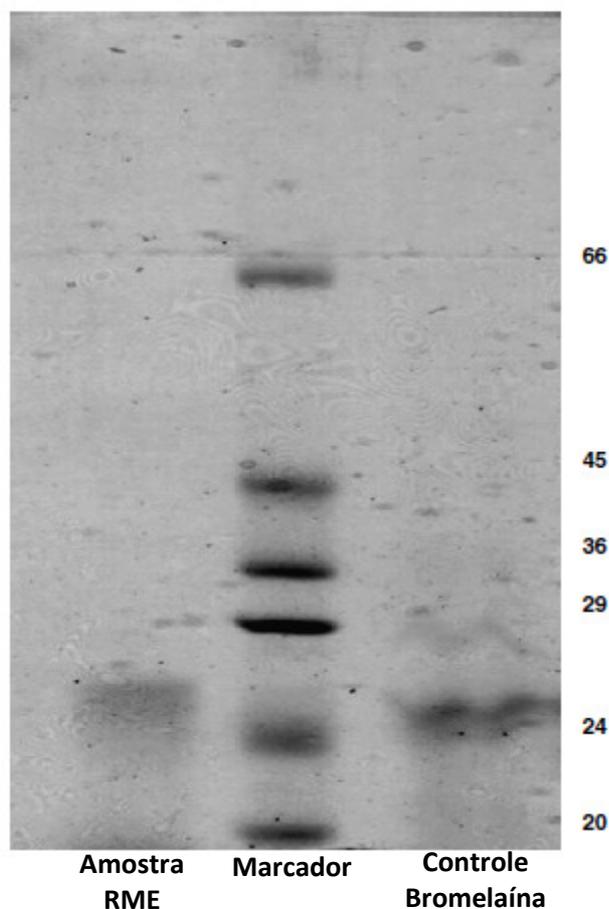


Figura 19 - SDS-PAGE análise da bromelaína extraída do caule pelo método de extração micelar reverso (HEBBAR *et al.*, 2008).

Hale *et al.* (2005) também purificaram extratos de abacaxi para testar a atividade e estabilidade de proteases presentes nas amostras. O método de purificação foi uma coluna cromatográfica de troca iônica (catiônica). A caracterização das proteases encontradas foi realizada pela composição de aminoácidos, sendo que dos três picos obtidos após a eluição do conteúdo aplicado na coluna, dois foram classificados como sendo bromelaína e um como ananaína. A análise por eletroforese confirmou a presença de duas bandas com peso de 22 e 28 kDa, correspondendo à ananaína e bromelaína, respectivamente.

Devakate *et al.* (2009) também purificaram bromelaína a partir do suco da polpa de abacaxi, por precipitação com sulfato de amônio $[(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4]$ cromatografia de troca iônica. Na precipitação, a purificação máxima obtida foi de 2,81 vezes e o rendimento de 41,1%, esse valores foram obtidos com sulfato de amônio na faixa de saturação de 40-60%. Já na cromatografia de troca iônica, a purificação máxima foi de 2,97 vezes e o rendimento de 69,7%, com sulfato de amônio na faixa de saturação de 40-70%.

Nesse trabalho, a purificação obtida no processo de separação das enzimas ficina e bromelaína usando a PANIG-I como fase estacionária de foi de 2,60 vezes para ficina e de 0,89 vezes para a bromelaína, e o rendimento obtido foi de 26,7% para ficina e 32,4% para bromelaína (**Tabela 6**).

Considerando os métodos usuais de separação, o presente trabalho parece ser bastante promissor. A purificação de proteases cisteínicas pelo uso de inibidores de *A. pavonina* imobilizados em PANIG é uma técnica que pode ser aplicada com sucesso nesse processo.

Tabela 6. Purificação de bromelaína e ficina em PANIG-I.

Enzima	Quantidade de Enzima aplicada (UE)	Quantidade de Proteína (mg)	Atividade específica (UE mg ⁻¹)	Fração eluída (NaOH)				
				UE	mg	UE mg ⁻¹	Purificação (x)	Rendimento (%)
Ficina	72	13,6	5,3	19	1,38	13,8	2,60	26,7%
Bromelaína	68	2,61	26,1	22	0,94	23,4	0,89	32,4%

5 CONCLUSÕES

A imobilização do inibidor em PANIG confirma a alta capacidade desse material para atuar como suporte, considerando sua capacidade de reter grande quantidade de proteínas ativas aliado à rapidez de sua produção e o baixo custo.

A utilização do inibidor imobilizado em polianilina (PANIG-I) para separação de proteases em cromatografia de afinidade mostrou ser uma técnica com um bom desempenho, já que em uma única etapa foi possível purificar parcialmente as proteases ficina e bromelaína partindo do extrato bruto e tipicamente, o processo de purificação de uma proteína é composto por múltiplas etapas.

6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABRAHAMSON, M. Cystatins - protein inhibitors of papain-like cysteine proteinases. **Journal of the Brazilian Association for the Advancement of Science**, v. 45, n. 5, p. 299-304. 1993.

ADAM, Z. Chloroplast proteases: possible regulators of gene expression? **Biochimie**, v. 82, n. 6-7, p. 647-654. 2000.

ALMEIDA, M. S.; KURTENBACH, E. Como purificar proteínas? O exemplo das defensinas antifúngicas de ervilha. **Biotecnologia, Ciência e Desenvolvimento**, v. 1, n. 24, p. 30-35. 2002.

ARAI, S.; MATSUMOTO, I.; EMORI, Y.; ABE, K. Plant seed cystatins and their target enzymes of endogenous and exogenous origin. **Journal of Agricultural and food Chemistry**, v. 50, n. 22, p. 6612-6617. 2002.

ARNON, R. **Papain**. In: PERLMANN, G.; LORAND, L (orgs). **Methods in Enzimology**. New York: Academic Press, p. 226-244. 1970.

BARBOSA, E. F.; **Imobilização de peroxidase em partículas de polianilina magnetizada e otimização de usos repetidos para construção de biossensor**. Anápolis, GO: UEG. Originalmente apresentada como trabalho de conclusão de curso, Universidade Estadual de Goiás. 2007.

BARRETT, A. J. The cystatins, a new class of protease inhibitors. **Trends in Biochemical Sciences**, v. 12, p. 193-196. 1987.

BARRETT, A. J. Classification of peptidases. **Methods in Enzimology**, v. 244, p. 1-15. 1994.

BARRETT, A. J.; RAWLINGS, N. D.; WOESSNER, J. F. **Handbook of proteolytic enzymes**. Elsevier Academic Press. 2004.

BAYRAMOGLU, G.; KARAKISLA, M.; ALTINTAS, B.; METIN, A. U.; SAÇAK, M.; ARICA, M. Y. Polyaniline grafted polyacrylonitrile conductive composite fibers for reversible immobilization of enzymes: stability and catalytic properties of invertase. **Process Biochemistry**, v. 44, n. 8, p. 880-885. 2009.

BICKERSTAFF, G. F. **Immobilization of enzyme and cells**. In: SCHMAUDER, H. P. (org.) **Methods in Biotechnology**, Totowa: Humana Press, p. 367. 1997.

BOUCHOLZ, K.; KASCHE, V.; BORNSCHEUER, U. T.; **Biocatalysts and enzyme technology**. Willey-VCH, p. 144. 2006.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle dye-binding. **Analytical Biochemistry**, v. 72, p. 680-85, 1976.

BOHAK, Z., SHARON, N. **Biotechnological applications of proteins and enzymes**. Academic Press. p. 367. 1967.

CAMPBELL, A. J. **Design, synthesis, and evaluation of cysteine proteases inhibitors**. Georgia, EUA: School of Chemistry and Biochemistry. Originalmente apresentada como tese de doutorado, Georgia Institute of Technology. 2005.

CARAMORI, S. S.; FERNANDES, K. F. Covalent immobilisation of horseradish peroxidase onto poly(ethylene terephthalate) - poly(aniline) composite. **Process Biochemistry**, v. 39, n. 7, p. 883-888. 2004.

CARAMORI, S. S. **Imobilização de enzimas em compósitos a base de polianilina**. Recife, PE: UFPE. Originalmente apresentada como tese de doutorado, Universidade Federal de Pernambuco. 2007.

CARAMORI, S. S.; FERNANDES, K. F. The use de poly (ethylene terephthalate) – poly (aniline) composite for trypsin immobilization. **Materials Science and Engineering**, v. 28, n. 7, p. 1159-1163. 2008.

CASTRO, L. B. R. **Imobilização de proteínas sobre superfícies de polissacarídeos**. São Paulo, SP. USP. Originalmente apresentada como tese de doutorado, Universidade de São Paulo. 2008.

CÉSAR, A. C. W. Análise de viabilidade econômica de um processo de extração e purificação de bromelina do abacaxi. Campinas, SP. UNICAMP. Originalmente apresentada como tese de doutorado, Universidade Estadual de Campinas. 2005.

DEVAKATE, R.V.; PATIL, V.V.; WAJE, S. S.; THORAT, B. N. Purification and drying of bromelain. **Separation and Purification Technology**, v. 64, p. 259-264. 2009.

ESTELLE, M. Proteases and cellular regulation in plants. **Current Opinion in Plant Biology**, v. 4, n. 3, p. 252-260. 2001.

FANTI, S.C. **Comportamento germinativo sob condições de estresse e do sombreamento artificial e adubo químico na produção de mudas de *Adenantha pavonina* L.** São Carlos, SP: UFSC. Originalmente apresentada como dissertação de mestrado, Universidade Federal de São Carlos. 1997.

FERNANDES, K. F.; LIMA, C. S.; PINHO, H.; COLLINS, C. H. Immobilization of horseradish peroxidase onto polyaniline polymers. **Process Biochemistry**, v. 38, n. 9, p. 1379-1384. 2003.

FERNANDES, K. F.; LIMA, C. S.; LOPES, F. M.; COLLINS, C. H. Properties of horseradish peroxidase immobilised onto polyaniline. **Process Biochemistry**, v. 39, n. 8, p. 957-962. 2004.

FONSECA, S. C. L.; PEREZ S. C. J. G. A. Ação do polietileno glicol na germinação de sementes de *adenantha pavonina* L. e o uso de poliaminas na atenuação do estresse hídrico sob diferentes temperaturas. **Revista Brasileira de Sementes**, v. 25, n. 1, p. 1-6. 2003.

FRANCO, O. L.; MELO, F. R. Osmoprotectant and plant strategies in response to osmotic stress. **Russian Journal of Plant Physiology**, v. 47, n. 1, p. 137-144. 2000.

GALIANI, P. D.; MALMONGE, J. A.; SANTOS, D. P.; MALMONGE, L. F. Compósitos de borracha natural com polianilina. **Polímeros: Ciência e Tecnologia**, v. 17, n. 2, p. 93-97. 2007.

GIANOTTI, A. **Produção recombinante e estudos funcionais de três novas cistatinas da cana-de-açúcar e sua utilização em estudos de inibição da adesão, proliferação, migração e invasão celular**. São Carlos, SP: UFSC. Originalmente apresentada como tese de doutorado, Universidade Federal de São Carlos. 2008.

GOMES, C. E. M. **Purificação, caracterização e atividade bioinseticida de um inibidor de tripsina de sementes de *Crotalaria pallida***. Natal, RN: UFRN. Originalmente apresentada como dissertação de mestrado, Universidade Federal do Rio Grande do Norte. 2004.

GRZONKA, Z.; JANKOWSKA, E.; KASPRZYKOWSKI, F.; KASPRZYKOWSKI, R.; LANKIEWICZ, L.; WICZK, W.; WIECZERZAK, E.; CIARKOWSKI, J.; DRABIK, P.; JANOWSKI, R.; KOZAK, M.; JASKOLSKI, M.; GRUBB, A. Structural studies of cysteine proteases and their inhibitors. **Acta Biochimica Polonica**, v. 48, n. 1, p. 1-20. 2001.

HALE, L. P.; GREER, P. K.; TRINH, C. T.; JAMES, C. L. Proteinase activity and stability of natural bromelain preparation. **International Immunopharmacology**, v. 5, p. 783-793. 2005.

HEBBAR, H.U.; SUMANA, B.; RAGHAVARAO, K. S. M. S. Use of reverse micellar system for the extraction and purification of bromelain from pineapple wastes. **Bioresource Technology**, v. 99, p. 4896-4902. 2008.

KENNEDY, J. F.; WHITE, C. A. Principles of immobilization of enzymes of transition metal-activated supports. **Methods in Enzymology**, v. 135, p. 117-130. 1987.

KIRK, O.; BORCHERT, T. V.; FUGLSANG, C. C. Industrial enzymes application. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 13, n. 4, p. 345-351. 2002.

LAGO, J. H. G.; SANTOS, J. A.; JULIANO, L.; ROMOFF, P.; CUNHA, R. L. O.R. **Triagem de atividades inibitórias de enzimas proteolíticas em extratos de *Baccharis***. Fortaleza, CE: RASBQ. Apresentado como pôster na 32^o Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química, de 30/05 a 02/06/2009. Centro de Convenções do Ceará. 2009.

LASKA, J. WLODARCZYK, J. ZABORSKA, W. Polyaniline as a support for urease immobilization. **Journal of Molecular Catalysis B Enzymatic**. v. 6, p.549-553. 1999.

LAWRENCE, P. L.; KOUNDAL, K. R. Plant protease inhibitors in control of phytophagous insects. **Electronics Journal of Biotechnology**, v. 5, n. 1, p. 93-109. 2002.

LEE, W.; HUANG, C. Immobilization of trypsin by thermo-responsive hydrogel for the affinity separation of trypsin inhibitor. **Desalination**, v. 234, n. 1-3, p. 195-203. 2008.

LEE, G.; KIM, J.; LEE, J. Development of magnetically separable polyaniline nanofibers for enzyme immobilization and recovery. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 42, n. 6, p. 466-472. 2008.

LEITE, V.; DA SILVA, V. L.; AZEVEDO, W. M.; MELO, E. H. M.; LIMA FILHO, J. L. Increasing glucose oxidase determination range by flow injection analysis (FIA) using glucose oxidase immobilized on polyaniline. **Biotechnology Techniques**, v. 8, n. 2, p. 133-136. 1994.

LOPES, F. M. **Biossensor espectrofotométrico para determinação de glicose**. Goiânia, GO: UFG. Originalmente apresentada como dissertação de mestrado, Universidade Federal de Goiás. 2003.

LOPES, J. L. S. **Purificação e investigação das propriedades físico-químicas de inibidores de proteases extraídos de sementes de *Acacia plumosa* Lowe**. São Carlos, SP: UFSC. Originalmente apresentada como dissertação de mestrado, Universidade Federal de São Carlos. 2006.

MACEDO, M. L. R.; GARCIA, V. A.; FREIRE, M. G. M.; RICHARDSON, M. Characterization of a Kunitz trypsin inhibitor with a single disulfide bridge from seeds of *Inga laurina* (SW.) Willd. **Phytochemistry**, v. 68, n. 8, p. 1104-1111. 2007.

MACHADO, P. M. **Imobilização de lectinas em polianilina para remoção de lactose do soro de leite bovino**. Goiânia, GO: UFG. Originalmente apresentada como dissertação de mestrado, Universidade Federal de Goiás. 2007.

MARGIS, R.; REIS, E. M.; VILLERET, V. Structural and Phylogenetic relationships among plant and animal cystatins. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 359, n. 1, p. 24-30. 1998.

MATEO, C.; PALOMO, J. M.; FERNANDEZ-LORENTE, G.; GUIBAN, J. M.; FERNANDEZ-LAFUENTE, R. Improvement of enzyme activity, stability and selectivity via immobilization techniques. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 40, n. 6, p. 1451-1463. 2007.

MENDONÇA, E. G. **Propriedades bioquímicas e cinético-enzimáticas de cisteína proteases do intestino médio da lagarta da soja**. Viçosa, MG: UFV. Originalmente apresentada como dissertação de mestrado, Universidade Federal de Viçosa. 2008.

MIGLIOLO, L. **Construção de modelos de interação *in silico* e *in vivo* do inibidor do tipo Kunitz de *Adenathera pavonina* L. para as enzimas cisteínicas e serínicas**. Natal, RN: UFRN. Originalmente apresentada como dissertação de mestrado, Universidade Federal do Rio Grande do Norte. 2008.

MONTI, R.; BASILIO C. A.; TREVISAN, H. C.; CONTIERO, J. Purification of papain from fresh latex of *Carica papaya*. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 43, n. 5, p. 501-507. 2000.

MOHR, P., POMMERENING, K. **Affinity chromatography: practical and theoretical aspects**. Marcel Dekker, p. 300. 1986.

MURACHI, T. Bromelain enzymes. In: LORAND, L. **Methods in Enzymology**, v. XLV, p475-485, New York, Academic Press, 1976.

OLIVA, M. L. V., SAMPAIO, M, U. & SAMPAIO, C. A. M. Purification and partial characterization of a thiol proteinase inhibitor from *Enterolobium contortisiliquum* beans. **Biol. Chem. Hoppe-Seyler**, v. 369, p. 229-232. 1988.

OLIVEIRA, A. S.; PEREIRA, R. A.; LIMA, L. M.; MORAIS, A. H. A.; MELO, F. R.; FRANCO, O. L.; BLOCH Jr, C.; GROSSI-de-SÁ, M. F.; SALES, M. P. Activity toward bruchid pest of a Kunitz-Type inhibitor from seeds of the Algoroba Tree (*Prosops juliflora* D.C.). **Pesticide Biochemistry and Physiology**, v. 72, n. 2, p. 122-132. 2002.

OLIVEIRA, A. S.; XAVIER-FILHO, J.; SALES, M. P. Cysteine proteinases and cystatines. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 46, n. 1, p. 91-104. 2003.

OLIVEIRA, I. R. W. Z.; VIEIRA, I. C. Construção e aplicação de biossensores usando diferentes procedimentos de imobilização de peroxidase de vegetal em matriz de quitosana. **Química Nova**, v. 29, n. 5, p. 932-939. 2006.

PASCOAL, A. M. **Imobilização de α -amilase de *Aspergillus niger* em polianilina**. Goiânia, GO: UFG. Originalmente apresentada como dissertação de mestrado, Universidade Federal de Goiás. 2005.

PRON, A.; GENOUD, F.; MENARDO, C.; NECHTSCHHEIN, M. The effect of oxidation conditions on the chemical polymerization of polyaniline. **Synthetic Metals**, v. 24, n. 3, p. 193-201, 1988.

PUD, A. OGURTSOV, N. KORZHENKO, A. SHAPOVAL, G. Some aspects of preparation methods and properties of polyaniline blends and composites with organic polymers. **Progress in Polymer Science**, v. 18, p. 1701-1753. 2003.

PURCENA, L. L. A. **Imobilização e caracterização de tripsina imobilizada covalentemente em polianilina**. Goiânia, GO: UFG. Originalmente apresentada como dissertação de mestrado, Universidade Federal de Goiás. 2008.

PURCENA, L. L. A.; CARAMORI, S. S.; MITIDIARI, S.; FERNANDES, K. F. The immobilization of trypsin onto polyaniline for protein digestion. **Material Science and Engineering**, v. 29, n. 4, p. 1077-1081. 2009.

RAWLINGS, N. D.; BARRETT, A. J. Families of cysteine proteases. **Methods in Enzymology**, v. 244, p. 461-486. 1994.

RAWLINGS, N. D.; MORTON, F. R.; BARRETT, A. J. MEROPS: the peptidase database. **Nucleic Acids Research**, v. 34, D270-D272. 2006.

RYAN, C. A. Protease inhibitor in plants: genes for improving defenses against insects and pathogens. **Annual Review of Phytopathology**, v. 28, p. 425-449. 1991.

ROWAN, A.D. BUTTLE, D. J. and BARRET, A. J. The cystein proteinases of the pineapple plant. **Biochemical Journal**, v. 266, n.3, p869-875, 1990.

SEGUNDO, B. S. Role of proteolytic enzymes in specific developmental processes in plants. AVILÉS, F. X. (org.). **Innovations in protease and their inhibitors**. New York, Walter De Gruyter, p. 349-367. 1993.

SGARBIERI, V. C. Enzimas proteolíticas do látex de diversas variedades de *Ficus carica* L. **Bragantia**, v. 24, p. 109-124. 1965.

STORER, A. C.; MÉNARD, R. Catalytic mechanism in papain family of cysteine peptidases. **Methods in Enzymology**, v. 244, p. 486-500. 1994.

SILVA, K. F. F. **Inibidores de papaína de *Adenanthera pavonina* L.** Fortaleza, CE: UFCE. Originalmente apresentada como dissertação de Mestrado, Universidade Federal do Ceará. 1991.

SILVA, K. F. F. LIMA, C. S. VAL, R. R. XAVIER-FILHO, J. Cysteine proteinase inhibitors from seeds of *Adenanthera pavonina* L. **Revista Brasileira de Botânica**, v. 18, p.137-141. 1995.

SILVA, K. F. F. **Imobilização de horseradish peroxidase em diferentes poli(anilinas): aplicações analíticas.** Campinas, SP: UNICamp. Originalmente apresentado como tese de doutorado, Universidade de Campinas. 2000.

SILVA, R. N.; ASQUIERI, E. R.; FERNANDES, K. F. Immobilization of *Aspergillus niger* glucoamylase onto a polyaniline polymer. **Process Biochemistry**, v. 40, n. 3-4, p. 1155-1159. 2005.

SOLOMON, M.; BELENGHI, B.; DELLEDONNE, M.; MENACHEM, E.; LEVINE, A. The involvement of cysteine protease and protease inhibitor genes in the regulation of programmed cell death in plants. **The Plant Cell**, v. 11, n. 3, p. 431-443. 1999.

SUGIURA, M.; M.; SAZAKI. Studies on proteinases from *Ficus carica* var. Hōraishi. V. Purification and properties of a sugar-containing proteinase (Ficin S) **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 350, n. 1, p. 38-47. 1974.

TAHIR, Z. M.; ALOCILJA, E. C.; GROOMS, D. L. Polyaniline synthesis and its biosensor application. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 20, n. 8, p. 1690-1695. 2005.

THANGARATHINAVELU, M.; TRIPATHI, A. K.; GOEL, T. C. VARMA, I. K. Preparation and characterization of polyaniline-PVC polymer composite film. **Journal of Applied Polymer Science**, v. 51, n. 7, p. 1347-1349. 1994.

THORNBERRY, N.; BULL, H. G.; CALAYCAY, J. R.; CHAPMAN, K. T.; HOWARD, A. D. A novel heterodimeric cysteine protease is required for interleukin-1b processing in monocytes. **Nature**, v. 356, n. 6372, p. 768-774. 1992.

USSUF, K. K.; LAXMI, N. H.; MITRA, R. Proteinase inhibitors: plant-derived genes os insecticidal protein for developing insect-resistant transgenic plants. **Current Science**, v. 80, n. 7, p. 847-853. 2001.

VALUEVA, T. A.; MOSOLOV, V. V. Protein inhibitors of proteinases in seeds: classification, distribution, structure, and properties. **Journal of Plant Physiology**, v. 46, n. 3, p. 307-321. 1999.

VIDAL, S. M. **Potencial biotecnológico das cistatinas**. Embrapa Algodão: Campina Grande - PB. 1ª ed. 27p. 2003.

XAVIER-FILHO, J.; AINOZ, IL. Protease inhibitor in meal of *Anacardium occidentale* seeds. **Biologia Plantarum**, v. 19, n. 3, p. 183-189, 1977.

XAVIER-FILHO, J. The biological roles of serine and cysteine proteinase inhibitors in plants. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, v. 4, n. 1, p. 1-6. 1992.

XAVIER-FILHO, J. Sementes e suas defesas contra insetos. **Imprensa da Universidade Federal do Ceará**. Fortaleza, CE. 1993.

ANEXOS

Anexo 1. Análises Estatísticas (ANOVA e Teste Tukey)

1. Influência da quantidade de PANIG na imobilização dos inibidores de *A. pavonina*

Fonte da variação	SQ	gl	MQ	F	valor-P	F crítico
Entre grupos	1,190956	2	0,595478	24,00045	0,001372	5,143253
Dentro dos grupos	0,148867	6	0,024811			
Total	1,339822	8				

<i>d.m.s</i>
0,304

Tukey		
Quantidade de PANIG (mg)	5	10
10	0	
15	0,77	0,77

2. Influência do pH na imobilização dos inibidores de *A. pavonina*

Fonte da variação	SQ	gl	MQ	F	valor-P	F crítico
Entre grupos	6,416358	3	2,138786	115,506	6,32E-07	4,066181
Dentro dos grupos	0,148133	8	0,018517			
Total	6,564492	11				

<i>d.m.s</i>
0,36

Tukey			
pH	5	6	7
6	1,13		
7	2,03	0,9	
8	0,75	0,38	1,28

3. Influência do tempo na imobilização dos inibidores de *A. pavonina*

Fonte da variação	SQ	gl	MQ	F	valor-P	F crítico
Entre grupos	1,133756	2	0,566878	9,089435	0,015281	5,143253
Dentro dos grupos	0,3742	6	0,062367			
Total	1,507956	8				

<i>d.m.s</i>
0,48

Tukey		
Tempo (min)	30	60
60	0,73	
90	0,78	0,05