



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”

**ANÁLISE FUNCIONAL E ESTRUTURAL COMPARATIVA DA
FASTUOSAINA COM PAPAÍNA E BROMELINAS.**

HAMILTON CABRAL

Tese de Doutorado apresentada para a
obtenção do título de doutor em Biofísica
Molecular, no programa de Pós-graduação
em Biofísica Molecular, do Instituto de
Biodiências, Letras e Ciências Exatas, da
Universidade Estadual Paulista “Julio de
Mesquita Filho”-UNESP-IBILCE.

Orientador: Prof. Dr. Gustavo Orlando Bonilla Rodriguez

São José do Rio Preto - SP

2005

AGRADECIMENTOS.

Ao Prof. Dr. Gustavo Orlando Bonilla Rodriguez, pela amizade, confiança, estímulo e a orientação durante este trabalho.

À FAPESP-Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo, pela bolsa de estudo outorgada e também pelos projetos de pesquisa concedidos envolvidos neste trabalho.

Ao grande apoio do Prof. Dr. Luiz Juliano, pela ajuda durante o desenvolvimento deste projeto.

À Prof. Dra. Maria Juliano, pela síntese e fornecimento dos peptídeos para a realização das cinéticas.

Ao Prof. Dr. Carlos Roberto Ceron, pela ajuda, e também por emprestar o seu laboratório.

À Prof. Dra. Heloisa Tajara pela liberação do espaço físico do seu laboratório para a realização dos experimentos de seqüenciamento e clonagem da enzima fastuosaina, e a Doutora Andréia Machado pela grande ajuda nos experimentos de seqüenciamento e clonagem da enzima fastuosaina.

Ao Prof. Dr. Jorge Chaine, pela ajuda durante o período de coordenadores da pós-graduação.

Ao Prof. Dr. Marcelo Fossey e João pela ajuda nos experimentos de dicroísmo circular.

À Prof. Dra. Maria de Lourdes, pela colaboração em realizar a determinação da composição de carboidratos.

Ao Prof. Dr. Maurício Boscolo por ceder o liofilizador.

Ao Prof. Dr. Mário Sergio Palma, pela realização da determinação da massa molecular.

Ao Prof. Dr. Rodolfo Travassos e a sua aluna de doutorado Carla Ferreira, pela colaboração em realizar os teste de inibição de tumores com a enzima fastuosaina.

À Prof. Dra. Ana Lúcia e as suas alunas Tatiane e Grazielle pela colaboração em realizar os experimentos de maturação de queijo com a enzima fastuosaina.

A banca de qualificação composta pelas Doutoradas Fernanda Canduri e Andréia Machado Leopoldino.

Aos suplentes da banca de qualificação, Prof. Dr. Walter Filgueira, e Prof. Dr. Roberto da Silva.

A banca de doutoramento composta pela Prof. Dra. Paula Rahal, Prof. Dr. Luiz Juliano, Prof. Dr. Vitor Marcelo de Oliveira, Prof. Dr. Marcos Fontes e Prof. Dr. Gustavo Bonilla.

Aos suplentes: Doutora Andréia Machado, aos Prof. Dr. Carlos Roberto Ceron e Prof. Dr. Flávio Henrique.

Ao meu grande amigo, Fábio Renato Lombardi, pela inestimável amizade, pelo companheirismo dentro e fora do laboratório e pela idéias e sugestões.

Ao grande amigo Wagner A. De Souza Júdice, pela ajuda e companheirismo durante este período do meu doutorado, e pela dicas e por me ensinar a realizar as cinéticas.

Ao meu grande amigo e irmão de graduação Guilherme, pela ajuda durante e incentivo durante este período.

Ao Luciano, Vitor e Jorge pela ajuda durante o período que estive em São Paulo.

À Dra. Izaura, pela grande amizade, e por colaborar sempre realizando os N-terminais para mim.

Às amigas, Alessandra Trovó, Alessandra Vidotto e Giovana, pela ajuda na eletroforese bi-dimensional e também pela convivência que tivemos e temos .

Aos meus amigos do laboratório: Cecília, Patrícia Caetano, Patrícia Perez, Débora, Rejane, Luciana, Ana Lúcia, e Fernando e Evandro, pela convivência.

À Neide pela amizade desenvolvida durante este período.

À Eliani, e à Rita, técnica e secretária do departamento de Química e Ciência Ambientais, pelas ajudas, dicas e incentivo.

Aos técnicos do departamento de Química e Ciência Ambientais Claudinei e João, pela ajuda e companhia durante este período.

Aos técnicos Paulinho e Barbosa e a secretária Ilva, do departamento de física pela ajuda.

Aos amigos Renato Caetano, José Henrique, Márcio, Júlio, Nelson, Pepeu, Mário, do departamento de física, e também à Fátima, à Márcia Cabreira.

Meu eterno agradecimento a minha querida e sempre lembrada família: Arnaldo e Neuza (pais), Ailton, Antonio, Adalberto, Aguinaldo (irmãos), Valéria, (irmã), Vanessa, Ana Paula, Adalberto, Nathália, Leonardo, Vitor e Giovanna (sobrinhas e sobrinhos) Fátima e Julio (cunhada e cunhado).

A Elza e Elaine, bibliotecárias, pela revisão das referências bibliográficas.

Às secretárias da secção de pós-graduação, Rosana, Silva e Rosemar pelas orientações.

A Deus, por tudo.

ÍNDICE

	Resumo	Pág. I
	Abstract	III
	Abreviações	V
1	INTRODUÇÃO	Pág. 1
1.1	Enzimas Proteolíticas	1
1.2	Aplicação e Importância Econômica das Peptidases.	2
1.3	Classificação das enzimas	2
1.4	Mecanismo catalítico	6
1.5	A Especificidade das Cisteíno-peptidases	7
1.6	Catálise nucleofílica	8
1.7	O Sítio Catalítico da Papaína	8
1.8	Família da Papaína (C1)	11
1.9	Evolução das Endopeptidases	12
1.10	Funções e localização das peptidases nas plantas	14
1.11	Cisteíno-peptidases do Abacaxi	16
1.12	Ocorrência e Caracterização	17
1.13	Localização	18
1.14	Possível Função (BOLLER, 1986)	18
1.15	Aplicações das peptidases do abacaxi	18
2	OBJETIVOS	20
3	MATERIAL E MÉTODOS	21
3.1	Identificação, coleta e estocagem dos frutos.	21
3.2	Obtenção do extrato bruto da fastuosaina.	22
3.3	Cromatografia de troca iônica da fastuosaina, bromelinada polpa e talo do abacaxi.	23
3.4	Cromatografia de filtração em gel, da fastuosaina e da bromelina do fruto e do talo.	24
3.5	Obtenção dos Frutos do abacaxi.	25

3.6	Extração das Enzimas do fruto e do talo do abacaxi.	25
3.6.1	Extração da Enzima do fruto e do talo do abacaxi.	26
3.7	Obtenção da papaína.	26
3.8	Ensaio enzimático.	26
3.9	Métodos de concentração das enzimas proteolíticas.	27
3.10	Eletroforese desnaturante em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE), para a determinação da pureza da enzima fastuosaina.	28
3.11	Secagem de gel de Poliacrilamida.	29
3.12	Síntese de Peptídeos.	29
3.12.1	Peptídeos com Fluorescência Apagada.	29
3.13	Titulação da papaína.	30
3.13.1	Titulação do inibidor Cistatina.	31
3.13.2	Titulação da fastuosaina e das bromelinas do talo e do fruto.	31
3.14	Titulação dos Substratos Abz-Peptidil-EDDnp.	32
3.14.1	Padronização do Fluorímetro para o Grupo Abz (Ácido o-aminobenzóico).	32
3.14.2	Padronização do Fluorímetro para Z-FR-MCA.	32
3.15	Cinética Enzimática.	33
3.16	Determinação da curva de pH ótimo das enzimas fastuosaina, papaína e bromelinas do talo e do fruto.	34
3.17	Determinação do efeito do NaCl, sobre a hidrólise do substrato Abz-KLRFSKQ-EDDnp, para as enzimas fastuosaina, papaína e bromelinas do talo e do fruto.	34
3.18	Efeito do agente desnaturante (uréia), sobre a atividade catalítica das enzimas fastuosaina, papaína e bromelinas do talo e do fruto.	34
3.19	Efeito da Estabilidade Térmica sobre a Atividade Catalítica das Peptidases	35
3.20	Modelagem Molecular da fastuosaina e das bromelinas do talo e do fruto.	36
3. 20.1	Procura de modelos.	37

3.20.2	Seleção dos modelos.	37
3.20.3	Alinhamento.	38
3.20.4	Construção do modelo.	38
3.20.5	Avaliação dos modelos.	39
3.20.6	Construção dos modelos gerados para as bromelina do talo e para a ananaina e fastuosaina.	40
3.20.7	Obtenção da estrutura tridimensional das enzimas fastuosaina, bromelina do talo e do fruto com os inibidores E-64 e E-64-c, através da técnica de modelagem molecular.	42
3.20.8	Modelagem Molecular da fastuosaina com a pro-região.	42
3.21	Análises de glicoproteínas.	42
3.21.1	Eletroforese desnaturante em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE), para a determinação da presença de glicoproteínas através da coloração do Reativo de Schiff.	42
3.21.2	Análises da composição de monossacarídeos por cromatografia líquida de troca aniônica (HPAEC).	44
3.21.2.1	Preparo das amostras das enzimas.	44
3.21.3	Hidrólise ácida.	44
3.21.4	Análises das amostras hidrolisadas no HPAEC.	45
3.22	Determinação da porcentagem das estruturas secundárias das enzimas fastuosaina, papaína e bromelina do talo e do fruto.	48
3.23	Análise da Massa Molecular da fastuosaina pelo Electrospray.	49
3.24	Extração do RNAm dos Frutos da <i>Bromelia fastuosa</i> .	50
3.24.1	Amplificação do RNAm e Síntese do cDNA.	51
3.24.2	Clonagem (Transformação).	52
3.24.3	PCR das colônias das células.	53
3.24.4	Extração e Purificação do DNA Plasmidial.	53
3.24.5	Precipitação do DNA Plasmidial para aplicação no seqüenciador.	55
3.25	Clonagem e Expressão da fastuosaina.	55

4	RESULTADOS	58
4.1	Purificação da fastuosaina.	58
4.2	Cinética Enzimática.	60
4.3	Determinação do pH ótimo das enzimas fastuosaina, bromelina do talo e do fruto e papaína.	70
4.4	Efeito da presença de uréia na atividade catalítica das enzimas fastuosaina, bromelina do talo e do fruto e da papaína, utilizando o substrato Abz-KLRFSKQ-EDDnp.	71
4.5	Efeito da presença de Cloreto de Sódio na atividade catalítica das enzimas fastuosaina, bromelina do talo e do fruto e da papaína, utilizando o substrato Abz-KLRFSKQ-EDDn.	72
4.6	Efeito da estabilidade térmica sobre a atividade catalítica da fastuosaina, bromelina do talo do fruto e da papaína.	73
4.7	Extração do RNA total, dos frutos da <i>Bromelia fastuosa</i> .	77
4.8	Caracterização preliminar da fastuosaina recombinante (fast-rec)	81
4.9	Determinação da estrutura secundária, utilizando Dicroísmo Circular.	85
4.10	Análise de glicoproteínas e determinação da composição da parte do carboidrato das enzimas fastuosaina, bromelina do talo e do fruto e da papaína.	86
4.11	Modelagem da enzima fastuosaina	91
4.12	Obtenção da estrutura tridimensional das enzimas ananaina e bromelina do talo, através da técnica de modelagem.	105
5	DISCUSSÃO.	126
6	CONCLUSÃO.	136
7	REFERÊNCIAS.	139
8	ANEXO.	148

ÍNDICE DE FIGURAS.

Fig. 1	Resíduos de aminoácidos com sua ligação peptídica.	Pág. 1
Fig. 2	Diagrama de distribuição das enzimas hidrolíticas.	2
Fig. 3	Classificação das peptidases, divisão em exo e endopeptidases.	4
Fig. 4	Esquema da terminologia das posições dos subsítios específicos das peptidases e seus resíduos de aminoácidos.	7
Fig. 5	Representação esquemática dos vários passos e supostos intermediários e estados de transições para a reação de hidrólise de um substrato amida por uma cisteíno-peptidase.	10
Fig. 6	Estrutura tridimensional da papaína.	12
Fig. 7	Representação de uma célula vegetal.	16
Fig. 8	Fluxograma resumindo o material e método.	21
Fig. 9	Foto da <i>Bromelia fastuosa</i> (gravatá).	22
Fig. 10	Foto do <i>Ananas comosus</i> (abacaxi havaiano).	25
Fig. 11	Representação de peptídeos de fluorescência apagada.	30
Fig. 12	Passos da modelagem molecular comparativa.	37
Fig. 13	Perfil cromatográfico da fastuosaina.	58
Fig. 14	Gel SDS-PAGE da fastuosaina.	59
Fig. 15	Espectrometria de massa da fastuosaina.	60
Fig. 16	Eficiência catalítica da Fastuosaina para o subsítio S ₁ , utilizando o substrato Abz-KLXFSKQ-EDDnp.	61
Fig. 17	Eficiência catalítica da Bromelina do Talo para o subsítio S ₁ , utilizando o substrato Abz-KLXFSKQ-EDDnp.	61
Fig. 18	Eficiência catalítica da Bromelina do Fruto para o subsítio S ₁ , utilizando o substrato Abz-KLXFSKQ-EDDnp.	61
Fig. 19	Eficiência catalítica da Papaína para o subsítio S ₁ , utilizando o substrato Abz-KLXFSKQ-EDDnp.	61
Fig. 20	Eficiência catalítica da Fastuosaina para o subsítio S ₂ , utilizando o substrato Abz-KLXFSKQ-EDDnp.	62

Fig. 21	Eficiência catalítica da Bromelina do Talo para o subsítio S_2 , utilizando o substrato Abz-KXRFSKQ-EDDnp.	62
Fig. 22	Eficiência catalítica da Bromelina do Fruto para o subsítio S_2 , utilizando o substrato Abz-KXRFSKQ-EDDnp.	63
Fig. 23	Eficiência catalítica da Papaína para o subsítio S_2 , utilizando o substrato Abz-KXRFSKQ-EDDnp.	63
Fig. 24	Eficiência catalítica da Fastuosaina para o subsítio S_3 , utilizando o substrato Abz-XLRFSKQ-EDDnp.	64
Fig. 25	Eficiência catalítica da Bromelina do Talo para o subsítio S_3 , utilizando o substrato Abz-XLRFSKQ-EDDnp.	64
Fig. 26	Eficiência catalítica da Bromelina do Fruto para o subsítio S_3 , utilizando o substrato Abz-XLRFSKQ-EDDnp.	64
Fig. 27	Eficiência catalítica da Papaína para o subsítio S_3 , utilizando o substrato Abz-XLRFSKQ-EDDnp.	64
Fig. 28	Eficiência catalítica da Fastuosaina para o subsítio S'_1 , utilizando o substrato Abz-KLRXSKQ-EDDnp.	65
Fig. 29	Eficiência catalítica da Bromelina do Talo para o subsítio S'_1 , utilizando o substrato Abz-KLRXSKQ-EDDnp.	65
Fig. 30	Eficiência catalítica da Bromelina do Fruto para o subsítio S'_1 , utilizando o substrato Abz-KLRXSKQ-EDDnp.	65
Fig. 31	Eficiência catalítica da Papaína para o subsítio S'_1 , utilizando o substrato Abz-KLRXSKQ-EDDnp.	65
Fig. 32	Eficiência catalítica da Fastuosaina para o subsítio S'_2 , utilizando o substrato Abz-KLRFXKQ-EDDnp.	66
Fig. 33	Eficiência catalítica da Bromelina do Talo para o subsítio S'_2 , utilizando o substrato Abz-KLRFXKQ-EDDnp.	66
Fig. 34	Eficiência catalítica da Bromelina do Fruto para o subsítio S'_2 , utilizando o substrato Abz-KLRFXKQ-EDDnp.	67
Fig. 35	Eficiência catalítica da Papaína para o subsítio S'_2 , utilizando o substrato Abz-KLRFXKQ-EDDnp.	67
Fig. 36	Eficiência catalítica da Fastuosaina para o subsítio S'_3 , utilizando o substrato Abz-KLRFSXQ-EDDnp.	68
Fig. 37	Eficiência catalítica da Bromelina do Talo para o subsítio S'_3 , utilizando o substrato Abz-KLRFSXQ-EDDnp.	68

Fig. 38	Eficiência catalítica da Bromelina do Fruto para o subsítio S' ₃ , utilizando o substrato Abz-KLRFSXQ-EDDnp.	68
Fig. 39	Eficiência catalítica da Papaína para o subsítio S' ₃ , utilizando o substrato Abz-KLRFSXQ-EDDnp.	72
Fig. 40	Determinação do pH ótimo das enzimas fastuosaina, bromelina do talo e do fruto e papaína, utilizando o substrato Abz-KLRFSKQ-EDDnp.	70
Fig. 41	Efeito da concentração de uréia na atividade catalítica das enzimas fastuosaina, bromelina do talo e do fruto e da papaína, utilizando o substrato Abz-KLRFSKQ-EDDnp.	71
Fig. 42	Efeito da presença de Cloreto de Sódio na atividade catalítica das enzimas fastuosaina, bromelina do talo e do fruto e da papaína, utilizando o substrato Abz-KLRFSKQ-EDDn.	72
Fig. 43	Efeito da estabilidade térmica da fastuosaina.	73
Fig. 44	Efeito da estabilidade térmica da bromelina do talo.	74
Fig. 45	Efeito da estabilidade térmica da bromelina do fruto.	75
Fig. 46	Efeito da estabilidade térmica da papaína.	76
Fig. 47	Gel do RNA total em agarose a 1%.	77
Fig. 48	Gel da amplificação do cDNA, em agarose a 1%.	78
Fig. 49	Seqüência do gene codificador da enzima fastuosaina.	79
Fig. 50	Seqüência dos resíduos de aminoácidos da fastuosaina.	79
Fig. 51	Alinhamento dos resíuos de aminoácidos das enzimas fastuosaina, ananaina, bromelina do talo e da papaína.	80
Fig. 52	Gel SDS-PAGE a 13% da fastuosaina recombinante.	81
Fig. 53	Curva de pH ótimo da fastuosaina recombinante.	82
Fig. 54	Efeito da concentração de uréia sobre a atividade catalítica da fastuosaina recombinante.	82
Fig. 55	Efeito da temperatura sobre a atividade catalítica da fastuosaina recombinante.	83
Fig. 56	Efeito da estabilidade térmica para a fastuosaina recombinante.	84

Fig. 57	Perfil dos espectros obtidos por dicroísmo circular das enzimas fastuosaina, bromelina do talo e do fruto e da papaína.	85
Fig. 58	Gel SDS-PAGE a 13% corado com Comassie R-250.	86
Fig. 59	Gel SDS-PAGE a 13% corado com Schiff.	86
Fig. 60	Alinhamento dos resíduos de aminoácidos da fastuosaina com o molde papaína.	91
Fig. 61	Estrutura terciária da fastuosaina.	92 e 93
Fig. 62	Gráfico de Ramachandran da fastuosaina.	94
Fig. 63	Alinhamento dos resíduos de aminoácidos da fastuosaina com o molde pró-caricaína.	95
Fig. 64	Estrutura terciária da pró-fastuosaina.	96
Fig. 65	Gráfico de Ramachandran da pró-fastuosaina.	98
Fig. 66	Alinhamento dos resíduos de aminoácidos da fastuosaina com o molde actinidina.	99
Fig. 67	Potencial eletrostático de superfície da fastuosaina complexada com o inibidor E-64.	100
Fig. 68	Gráfico de Ramachandran da fastuosaina complexada com o inibidor E-64.	101
Fig. 69	Alinhamento dos resíduos de aminoácidos da fastuosaina com o molde papaína complexada com o inibidor E64-c.	102
Fig. 70	Potencial eletrostático de superfície da fastuosaina complexada com o inibidor E-64-c.	103
Fig. 71	Alinhamento dos resíduos de aminoácidos da ananaína com o molde papaína.	105
Fig. 72	Estrutura terciária da ananaina.	106 e 107
Fig. 73	Gráfico de Ramachandran da ananaína.	108
Fig. 74	Alinhamento dos resíduos de aminoácidos da ananaína com o molde actinidina.	109
Fig. 75	Potencial eletrostático de superfície da ananaína complexada com o inibidor E-64.	110
Fig. 76	Gráfico de Ramachandran da ananaína complexada com o inibidor E-64.	111

Fig. 77	Alinhamento dos resíduos de aminoácidos da ananaína com o molde papaína complexado com o inibidor E-64-c.	112
Fig. 78	Potencial eletrostático de superfície da ananaina complexada com o inibidor E-64-c.	113
Fig. 79	Gráfico de Ramachandran da ananaína complexada co o inibidor E-64-c.	114
Fig. 80	Alinhamento dos resíduos de aminoácidos da bromelina do talo com o molde papaína.	115
Fig. 81	Estrutura terciária da bromelina do talo.	116 e 117
Fig. 82	Gráfico de Ramachandran da bromelina do talo.	118
Fig. 83	Alinhamento dos resíduos de aminoácidos da bromelina do talo com o molde actinidina.	119
Fig. 84	Potencial eletrostático de superfície da bromelina do talo complexada com o inibidor E-64.	120
Fig. 85	Gráfico de Ramachandran da bromelina do talo complexada com o inibidor E-64.	121
Fig. 86	Alinhamento dos resíduos de aminoácidos da bromelina do talo com o molde papaína complexado com o inibidor E-64-c.	122
Fig. 87	Potencial eletrostático de superfície da bromelina do talo complexada com o inibidor E-64-c.	123
Fig. 88	Gráfico de Ramachandran da bromelina do talo complexada com o inibidor E-64-c.	124

ÍNDICE DE TABELAS.

Tabela 1	Clãs e famílias das cisteíno-peptidases.	Pág. 5
Tabela 2	Constante de dissociação de carboidratos.	47
Tabela 3	Iniciadores para amplificação da Fast-rec.	55
Tabela 4	Resumo dos dados de eficiência catalítica das enzimas fastuosaina, papaína, bromelina do talo e do fruto.	69
Tabela 5	Determinação e quantificação da composição da porção de carboidrato presente na fastuosaina.	87
Tabela 6	Determinação e quantificação da composição da porção de carboidrato presente na Bromelina do Talo.	88
Tabela 7	Determinação e quantificação da composição da porção de carboidrato presente na Bromelina do Fruto.	89
Tabela 8	Determinação e quantificação da composição da porção de carboidrato presente na fastuosaina na papaína.	90
Tabela 9	Valores de r.m.s. para fastuosaina, comparado com outras cisteíno-peptidases.	103
Tabela 10	Valores de d.r.m.s. para pró-fastuosaina, comparado com outras pró-cisteíno-peptidases.	104
Tabela 11	Valores de d.r.m.s. para bromelina do talo e ananaína, comparado com outras cisteíno-peptidases.	125

RESUMO.

As peptidases ou proteases hidrolisam ligações peptídicas. Apesar de todas terem essa característica funcional comum, elas diferem acentuadamente no seu grau de especificidade. O conhecimento da especificidade das cisteíno-peptidase, nos fornece valiosas informações que podem levar a uma melhor compreensão da relação estrutura-função, do papel fisiológico destas enzimas, ou para o desenho de inibidores seletivos.

Pela caracterização realizada, a Fastuosaina, uma cisteíno peptidase extraída de frutos verdes de gravatá (*Bromelia fastuosa*) possui um pH ótimo próximo do neutro, semelhante à Bromelina do talo e do fruto, por enquanto para a Papaína, que possui um pH ótimo de 6,3.

Em relação à estabilidade térmica, a Fastuosaina mostrou ser mais resistente à desnaturação, seguida pela Papaína, a Bromelina do fruto e por último a Bromelina do talo.

A elevação da força iônica causada pela adição de NaCl mostrou um efeito ativador na atividade catalítica das peptidases Fastuosaina e Papaína e bifásico para as Bromelinas do talo e do fruto. Para estas enzimas, ocorre uma primeira fase de inibição e uma segunda de recuperação da atividade.

Quanto ao mapeamento dos subsítios, a Fastuosaina apresentou alguma peculiaridade, como por exemplo, preferência por Pro em P_1 , e em todos os subsítios a preferência por resíduos apolares, exceto em P_3 , onde a preferência é por resíduos básicos. A Fastuosaina tem baixa afinidade pelos resíduos de Aspartato e Glutamato.

O mapeamento dos subsítios da Bromelina do talo mostrou que esta enzima tem preferência por resíduos apolares nos subsítios, P_2 , P_3 , P_1 e P_3 e básicos para os subsítios P_1 e P_2 .

No caso da Bromelina do fruto, esta apresentou preferência por resíduos apolares nos subsítios P₂, P₁, P₃, e básicos para P₁ e P₂ e polar para P₃.

A Papaína apresentou preferência por resíduos apolares em todos os subsítios.

Quanto à seqüência primária, obtida pelo seqüenciamento do gene, a Fastuosaina mostrou uma alta identidade com as bromelinas, extraídas do abacaxi comestível da mesma família (Bromeliceae). A seqüência gênica foi depositada no Gene Bank com número de acesso AY563270. Foi feita a determinação da sua massa molecular por espectrometria de massa, obtendo 25,4 kD.

A Fastuosaina modelada, mostrou semelhanças com a Papaína na seqüência primária, a disposição de dois domínios, separados por uma fenda na qual se encontra o sítio catalítico, por possuir sete resíduos de cisteína, e também pela disposição das estruturas secundárias hélice alfa e folha beta, como previsto, pois a Fastuosaina pertence a família dea Papaína.

A Fastuosaina apresenta uma porção de carboidratos, sendo, portanto uma glicoproteína, semelhante às bromelinas do talo e do fruto.

A Fastuosaina clonada, denominada Fast-rec, foi expressa em *E. coli*. Foi parcialmente purificada mostrou um pH ótimo por volta de 7,0, semelhante à fastuosaina nativa sendo mais sensível a estabilidade térmica e também a concentração de sal.

A Fastuosaina tem mostrado algumas diferenças funcionais com as enzimas com as quais foi comparada, e aplicações na área de alimentos têm mostrado resultados promissores. O projeto continuará com a enzima clonada, visando efetuar testes de aplicação nas áreas de biotecnologia, alimentos e farmacologia.

ABSTRACT

Peptidases, also known as proteases, hydrolyse peptide bonds with different specificities. Knowing their preferences for cleavage sites, gives valuable informations that can lead to a better understanding of the structure-function relationships, their physiological role, or for design of selective inhibitors.

We performed a characterization of Fastuosain, a cystein-peptidase isolated from unripe fruits of "gravatá" (*Bromelia fastuosa*), which showed an optimum pH near 7.0, as found also for stem and fruit bromelains. Papain showed a lower value, at pH 6.3.

Concerning its thermal stability, Fastuosain showed higher resistance to denaturation, followed by Papain, Fruit and Stem Bromelain.

Ionic strength, set by NaCl, showed an activation of the catalytic activity for Fastuosain and Papain, and a biphasic behavior for both Bromelains. For these enzymes we verified first an inhibition, followed by a recovery phase at higher salt concentrations.

Concerning subsites mapping, Fastuosain presented some peculiarity, as a preference for Pro at P_1 , and for most of the subsites hydrophobic residues, with exception of P_3 , where prefers basic residues. Fastuosain has a low affinity for Aspartate and Glutamate.

For Stem Bromelain, the mapping showed a preference for hydrophobic residues at P_2 , P_3 , P_1 and P_3 , and basic ones for P_1 and P_2 .

Fruit Bromelain presented a preferential binding of hydrophobic residues at P_2 , P_1 , P_3 , basic ones at P_1 and P_2 and a polar for P_3 .

Papain displayed a global preference for hydrophobic residues.

In terms of its primary sequence, obtained by gene sequencing, Fastuosain showed a high identity with bromelains extracted from the edible pineapple, that

belongs to the same family (Bromeliceae). The gene sequence was deposited at the Gene Bank with access number AY563270. We also carried out a determination of its molecular mass by MS, obtaining 25.4 kDa.

The structure of Fastuosain was modelled using Papain as a template, (9PAP) and showed, as expected, similarities with the second enzyme in terms of its primary sequence, the existence of two domains separated by a cleft that holds the catalytic site, seven conserved cysteine residues, and also the distribution of the secondary structures alpha helix and beta sheets.

Fastuosain also presented bound carbohydrates, being, accordingly, a glycoprotein, analogous to stem and fruit bromelains.

The enzyme was cloned, and named Fast-rec, was expressed in *E. coli*. After being partially purified, showed an optimum pH around 7.0, similar to the native Fastuosain, although being more sensitive to temperature and salt concentration.

Fastuosain has shown some functional differences with the enzymes of this comparative analysis, and some tests in food processing have promising results. The project will continue with the cloned enzyme, aiming trial tests in biotechnology, food processing and pharmacology.

Abreviações Utilizadas.

Abreviações dos Aminoácidos

Nome dos aminoácidos	Abreviação 3 letras	Abreviação 1 letra
ALANINA	Ala	A
ASPARAGINA	Asn	N
ÁCIDO ASPARTICO	Asp	D
ARGININA	Arg	R
CISTEÍNA	Cys	C
FENILALANINA	Phe	F
GLICINA	Gly	G
GLUTAMINA	Gln	Q
ÁCIDO GLUTAMICO	Glu	E
HISTIDINA	His	H
ISOLEUCINA	Ile	I
LEUCINA	Leu	L
LISINA	Lys	K
METIONINA	Met	M
PROLINA	Pro	P
SERINA	Ser	S
TIROSINA	Tyr	Y
TREONINA	Thr	T
TRIPTOFANO	Trp	W
VALINA	Val	V

Outras Abreviações Utilizadas

Abz	Ácido o-aminobenzóico
BAEE	Benzoil-L-Arginina etil ester
CD	Dicroísmo Circular
DTT	Ditiotrietol
EDDnp	2,4-etilenodiaminodinitrofenil
EDTA	Ácido etilenodiaminotetracético
E-64	Trans-Epoxisuccinil-LLeucilamida(4-guanidino)-butano
HPAEC	Cromatografia líquida de troca aniônica
MCA	7-amidometil-coumarina
PAS	Ácido periódico de Schiff
PDB	Banco de Dados de Proteínas “ <i>Protein Data Bank</i> ”
r.m.s.	desvio médio quadrático
SDS-PAGE	Gel de poliacrilamida com dodecil sulfato de sódio
SDS	Dodecil sulfato de sódio
TCA	Ácido tricloroacético
TFA	Ácido Trifluoroacético
TEMED	N, N, N',N' tetrametil etilenodiamina
Tris	Tri(hidroximetil)aminometano
λ_{em}	Comprimento de onda de emissão
λ_{ex}	Comprimento de onda de excitação
UFA	Unidades arbitrárias de fluorescência
UV	Ultravioleta
VIS	Visível
X-GAL	5-bromo-4-cloro-3-indolil- β -D-galactoctosídio

1. INTRODUÇÃO.

1.1 Enzimas Proteolíticas.

As peptidases ou proteases, hidrolisam ligações peptídicas (figura 1). Apesar de todas terem essa característica funcional comum, elas diferem acentuadamente no seu grau de especificidade (STRYER, 1996).

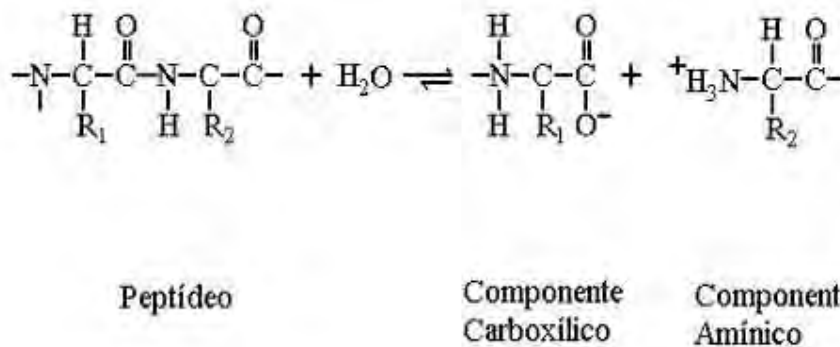


Figura 1. Esta figura ilustra dois resíduos com a sua ligação peptídica mostrada em vermelho, a qual é clivada por uma peptidase, liberando assim dois componentes, um carboxílico e o outro amínico (STRYER, 1996).

O uso de enzimas para modificar propriedades funcionais de proteínas tem uma promissora aplicação na indústria de alimentos. A grande vantagem do uso de enzimas comparado com outros agentes, inclui a sua especificidade e o fato de serem efetivas em baixas concentrações (MAHAJAN, 1998).

Muitas das enzimas são utilizadas na modificação de proteínas alimentares. A ação destas peptidases sobre esses substratos causa a hidrólise parcial da proteína, alterando assim suas propriedades funcionais, tais como: solubilidade, emulsificação, gelificação, viscosidade, hidratação, sabor, etc (MAHAJAN, 1998).

As peptidases também podem ser utilizadas em processos de biotecnologia, tal como na extração de DNA de células de eucariotos (GEHELHU et al., 1998; CABRAL et al., 2000).

1.2 Aplicação e Importância Econômica das Peptidases.

As peptidases são uma classe única de enzimas que ocupam uma posição central, devido as suas aplicações em ambos os campos fisiológico e comercial.

Os avanços nas técnicas analíticas têm demonstrado que algumas peptidases apresentam alta especificidade e seletividade na modificação de proteínas. Como exemplos podemos citar, a ativação de zimogênios através de hidrólise limitada, coagulação sangüínea, lise de coágulo de fibrina e processamento e transporte de proteínas secretadas da membrana do acrossomo. Outras, como várias peptidases vegetais, têm menor seletividade (RAO et al., 1998).

O valor atual estimado da venda mundial de enzimas industriais é de 1 bilhão de Dólares; destas enzimas industriais, 75% são hidrolíticas. As peptidases representam 1/3 deste grande grupo de enzimas industriais, e aproximadamente 60% do total das vendas mundiais das enzimas, como ilustrado pelo diagrama na figura 2 (RAO et al., 1998).

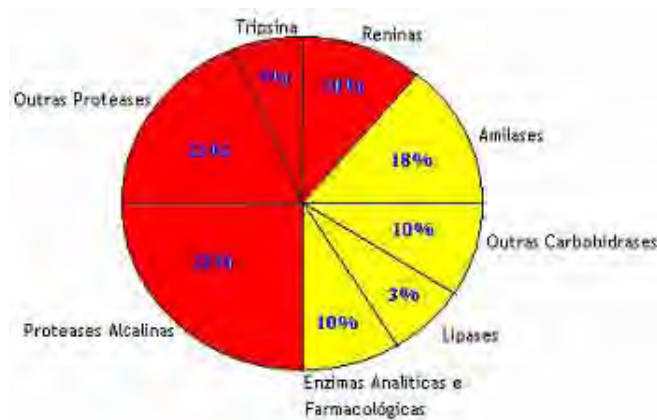


Figura 2. Distribuição da escala de utilização das enzimas, e a contribuição percentual de cada tipo. Figura extraída e modificada de RAO et al., (1998).

1.3 Classificação das enzimas.

A classificação das enzimas consiste na sua organização dentro de grupos com atividades e características catalíticas similares. A nomenclatura das enzimas

está de acordo com os princípios, regras e recomendações de um Código Internacional estabelecido em 1961 pela IUBMB¹ (WHITAKER, 1972).

De acordo com a Comissão de Enzimas (E.C.), foi estabelecido que a classificação das enzimas seja baseada na sua ação catalítica, possuindo também um código numérico, formado por um conjunto de 4 números separados por pontos.

Com esse sistema as enzimas foram classificadas dentro de 6 classes principais. Cada classe passou a ter um número particular segundo a relação abaixo: o primeiro dígito indica a classe à qual a enzima pertence:

Número	Classe	Descrição funcional
1	Oxidoredutases	enzimas que catalisam reações envolvendo transferências de elétrons.
2	Transferases	enzimas que transferem um grupo de um composto para outro.
3	Hidrolases	enzimas que clivam ligações químicas por adição de água.
4	Liasas	enzimas que adicionam grupos a duplas ligações ou produzem duplas ligações por remoção de grupos.
5	Isomerases	enzimas que transferem grupos dentro de uma molécula produzindo isômeros.
6	Ligases	enzimas que ligam 2 moléculas através de uma reação, usando eventualmente ATP como fonte de energia (LEHNINGER et al, 1996; VOET e VOET, 1995).

¹ Sigla em inglês da União Internacional de Bioquímica e Biologia Molecular

No caso das hidrolases, classe na qual se enquadram as peptidases, o segundo dígito indica o tipo de ligação afetada pela hidrólise. Dessa forma, temos: 1 para hidrólise de ligação éster, 2 para ligação glicosídica, 3 para ligação éter, 4 para ligação peptídica, e 5 para hidrólise de ligação C-N que não constitui ligação peptídica. Assim, estas enzimas possuem E.C. 3.4.x.x., com o terceiro número obedecendo à classificação a seguir.

O terceiro número para as peptidases pode se encontrar em uma de três faixas: do 11 ao 19, do 21 ao 24 e 99. O primeiro grupo que é do 11 ao 19, são aquelas enzimas que hidrolisam ligações peptídicas nas extremidades amina e carboxila de proteínas; essas enzimas são chamadas de exopeptidases (figura 3).

O segundo grupo que vai do 21 ao 24, são as enzimas que hidrolisam ligações peptídicas internas nas proteínas, essas enzimas são chamadas de endopeptidases (figura 3). O último grupo é reservado às enzimas cujo mecanismo de ação é desconhecido (GARCÍA-CARREÑO, DEL TORO, 1997).

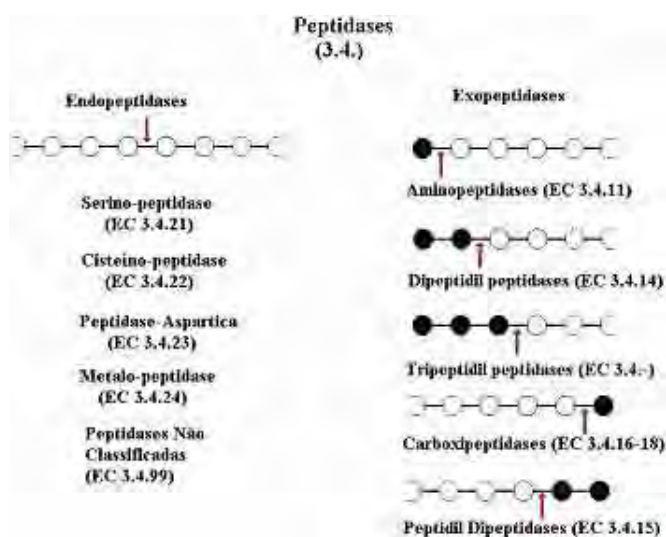


Figura 3. Classificação das peptidases. Divididas em exopeptidases e endopeptidases. Figura extraída e modificada de BARRETT, 1986.

O quarto número é sequencial , na ordem da catalogação da enzima.

Segundo RAWLINGS e BARRETT (1994), aproximadamente 20 famílias de peptidases dependem de um resíduo de cisteína (Cys) no sítio catalítico, (tabela 1). Como é conhecido, a atividade das cisteíno-peptidases depende da presença, no sítio catalítico, de um resíduo de cisteína e outro de histidina. A ordem desses resíduos (Cys/His ou His/Cys) na sequência linear difere entre as famílias, e a ordem destas famílias estão descritas na tabela 1.

Tabela 1. Clãs e famílias das Cisteíno-peptidases.

Clã	Família	Enzima Representativa	Resíduo catalítico
CA	C1	Papaína	Cys/His
CA	C2	Calpaína	Cys
CA	C10	Estreptopapaína	Cys/His
CB	C3	Polio Vírus Picornaína 3C	His/Cys
CB	C4	<i>Tabaco etch Vírus Nia endopeptidases</i>	His/Cys
-----	C18	Endopeptidases 2 Vírus C da Hepatite	His/Cys
-----	C5	Endopeptidases de Adenovírus	His/Cys
CC	C6	Tabaco etch Vírus HC-peptidaseS	Cys/His
CC	C7	<i>Chestnut blight Vírus p29 endopeptidases</i>	Cys/His
-----	C8	<i>Chestnut blight Vírus p48 endopeptidases</i>	Cys/His
-----	C9	<i>Sindis Vírus nsP2 endopeptidases</i>	Cys/His
-----	C16	Endopeptidases Vírus da Hepatite de Rato	Cys/His
-----	C21	Turnip amarelo Vírus mosaico endopept.	Cys/His
-----	C11	Clostripaína	Cys
-----	C12	Peptidases de desubiquitinação Yuh1	Cys/His
-----	C19	Peptidases de desubiquitinação Ybp1	Cys/His
-----	C13	Hemoglobinas	-----
-----	C14	Interleucina 1 β enzima convergente	Cys
-----	C15	Piroglutamil-peptidases I	Cys
-----	C17	Microsomal ER 60 endopeptidases	-----
-----	C20	<i>Tipo IV prepilin leader peptidases</i>	-----

Fonte: RAWLINGS e BARRETT, 1994.

As famílias C_1 , C_2 e C_{10} , podem ser descritas como sendo do “tipo da papaína” (*papain-like*), e do Clã CA. Quase metade das famílias mostradas, (C_3 , C_4 , C_{18} , C_5 , C_6 , C_7 , C_8 , C_9 , C_{16} e C_2), são representantes unicamente de peptidases de vírus. As famílias (C_{11} , C_{15} , e C_{20}), são encontradas em bactérias e outros organismos eucariotos (BARRETT et al., 1998).

O nome do Clã é formado da letra do tipo catalítico (como das famílias), acompanhado por uma segunda letra arbitrária principal. No Clã CA, são colocadas enzimas cujos resíduos do par catalítico encontram-se na ordem Cys/ His, e mostram limitada conservação de aminoácidos ao redor dos resíduos catalíticos (BARRETT et al., 1998).

Cada família de peptidase é nomeada com uma letra denotando o seu tipo catalítico, (S, T, C, A, M, ou U), que corresponde respectivamente à: serina, treonina, cisteína, aspártico, metalo ou desconhecida (BARRETT et al., 1998).

1.4 Mecanismo catalítico.

Baseando-se no mecanismo químico da catálise, as peptidases pertencem a dois grupos:

- a) Aquelas que formam complexo covalente durante o estado de transição, que são as serino e cisteíno-peptidases;
- b) Aquelas que não formam o complexo covalente, que são as metalopeptidases e peptidases-aspárticas (GARCÍA-CARREÑO, DEL TORO, 1997).

Estas propriedades são da maior importância, pois o mecanismo de controle da atividade pelos inibidores é muito diferente. A formação do complexo covalente nas peptidases é devido à presença de aminoácidos que agem como agentes nucleofílicos, no seu sítio catalítico (VOET e VOET, 1995).

1.5 A Especificidade das Cisteíno-peptidases.

O conhecimento da especificidade das cisteíno-peptidases, fornece valiosas informações que podem levar a uma melhor compreensão do papel fisiológico destas enzimas, ou auxiliar no desenho de inibidores seletivos (MENÁRD, 1993).

Os primeiros estudos de especificidade de cisteíno-peptidases, foram centralizados principalmente sobre as enzimas de plantas, mais especificamente a papaína (MENÁRD, 1993).

SCHECHTER e BERGER, (1967), demonstraram que os substratos interagem com 7 subsítios na papaína (figura 4) e que a especificidade primária determinante seria dada pelo resíduo em P_2 .

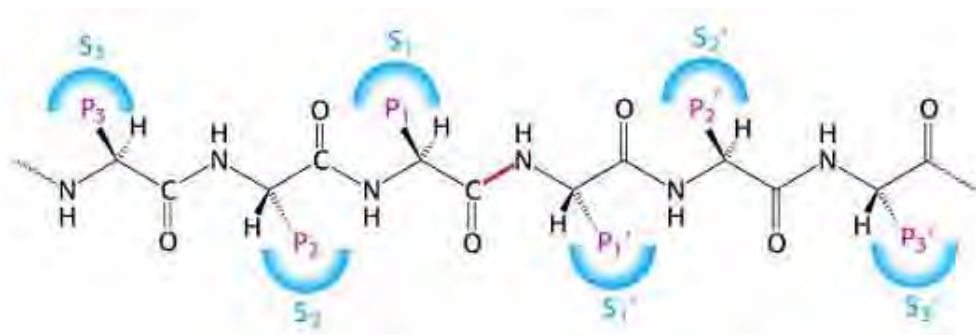


Figura 4. Esquema da terminologia das posições dos subsítios específicos das peptidases e seus resíduos de aminoácidos do substrato. Os subsítios são numerados em $S_1 \dots S_n$, a partir do sítio de hidrólise que fica entre o S_1 e S_1' , no sentido do N-terminal, e $S_1' \dots S_n'$, no sentido C-terminal.

As interações entre os subsítios de uma peptidase e os resíduos de aminoácido de um substrato peptídico podem contribuir significativamente para entender a eficiência catalítica. No caso da papaína, o subsítio S_2 controla a especificidade, devido à preferência de um resíduo de aminoácido hidrofóbico, em particular a fenilalanina, na posição P_2 do substrato (ASBOTH, 1988).

A especificidade dos subsítios S , foi estudada em detalhe devido à

disponibilidade de pequenos substratos sintéticos ésteres e amidas, contendo um grupo cromogênico ligado ao C-terminal do peptídeo (MENÁRD, 1993).

A desvantagem destes substratos é que não se pode estudar a especificidade do lado P'. Muito pouco é conhecido sobre a especificidade do subsítio S' das cisteíno-proteases. A abordagem de mapeamento usa substratos de fluorescência apagada (MENÁRD, 1993). A principal característica de tais substratos é a presença, simultânea de um grupo de fluorescência e um grupo que age como um apagador interno quando o substrato peptídico está intacto (MENÁRD, 1993).

1.6 Catálise nucleofílica.

Em enzimas, os grupos nucleofílicos que são funcionais na catálise são a hidroxila da cadeia lateral de um resíduo de serina, que ocorre nas serino-peptidases, esterases, lipases, e fosfatases ácidas e alcalinas, o grupo tiólico de cisteína, que ocorre nas cisteíno peptidases (papaína, ficina, bromelina, etc). O imidazol de um resíduo de histidina usualmente funciona como um catalisador ácido-base, e aumenta o caráter nucleofílico dos grupos tiólico e hidroxila (FERSHT, 1995).

1.7 O Sítio Catalítico da Papaína.

Por definição, cisteíno-peptidases requerem o grupo tiólico de um resíduo de cisteína para a sua atividade. Com o advento dos dados estruturais, foi demonstrado que uma histidina está localizada nas vizinhanças do sítio ativo próximo do resíduo de cisteína e provavelmente esteja envolvida no processo de catálise, (STORER e MÉNARD, 1994).

Provavelmente o aspecto das cisteíno-proteases de importância primária para sua atividade catalítica é o caráter nucleofílico do grupo tiólico presente no sítio catalítico. Isto é geralmente aceito de forma ativa da papaína e das cisteíno-peptidases, que possuem um par iônico tiol-imidazol (STORER e MÉNARD, 1994).

Os resíduos de Cys-25 e Gln-19, residem no domínio (I) mostrado na parte inferior da figura 6, enquanto os resíduos His-159 e Asn-175, estão localizados no domínio superior (II) (McGRATH, 1999).

Sabe-se que os pK_a s dos resíduos são perturbados de forma significativa: o pK_a da Cys diminui para pH 4,0 e o da His para 8,5 (MÉNARD, 1993).

Segundo SCHECHTER e BERGER (1967), para a investigação do tamanho do centro catalítico da papaína foram estudadas 40 diastereoisômeros de oligopeptídeos da alanina, variando o seu comprimento de Ala₂ até Ala₆.

Os subsítios são localizados em ambos lados do sítio ativo catalítico, 4 no lado N-Terminal e 3 no lado C-Terminal. Dessa forma, o substrato é visualizado como estando situado dentro de uma fenda, ligado por diferentes subsítios de geometria específica (SCHECHTER e BERGER, 1967).

O sítio catalítico de uma enzima realiza duas funções: primeiro; ligar o substrato e segundo; catalisar a reação. A eficiência destas ações determinam a atividade da enzima para um substrato particular, ou seja, a especificidade da enzima. Portanto, os estudos cinéticos das enzimas fornecem informações importantes sobre o centro catalítico das enzimas através de reações com diferentes substratos. Uma importante característica do sítio ativo é seu tamanho, sendo possível medi-lo considerando a utilização de substratos ou inibidores (SCHECHTER e BERGER, 1967).

As características básicas do mecanismo incluem a formação de um intermediário de acil-enzima, resultante de um ataque nucleofílico do grupo tiol da cisteína do sítio ativo ao carbono da carbonila da amida ou da ligação éster do substrato ligado (STORER e MÉNARD, 1994).

O mecanismo da hidrólise de um substrato amida, envolve algumas etapas que estão representadas na figura 5.

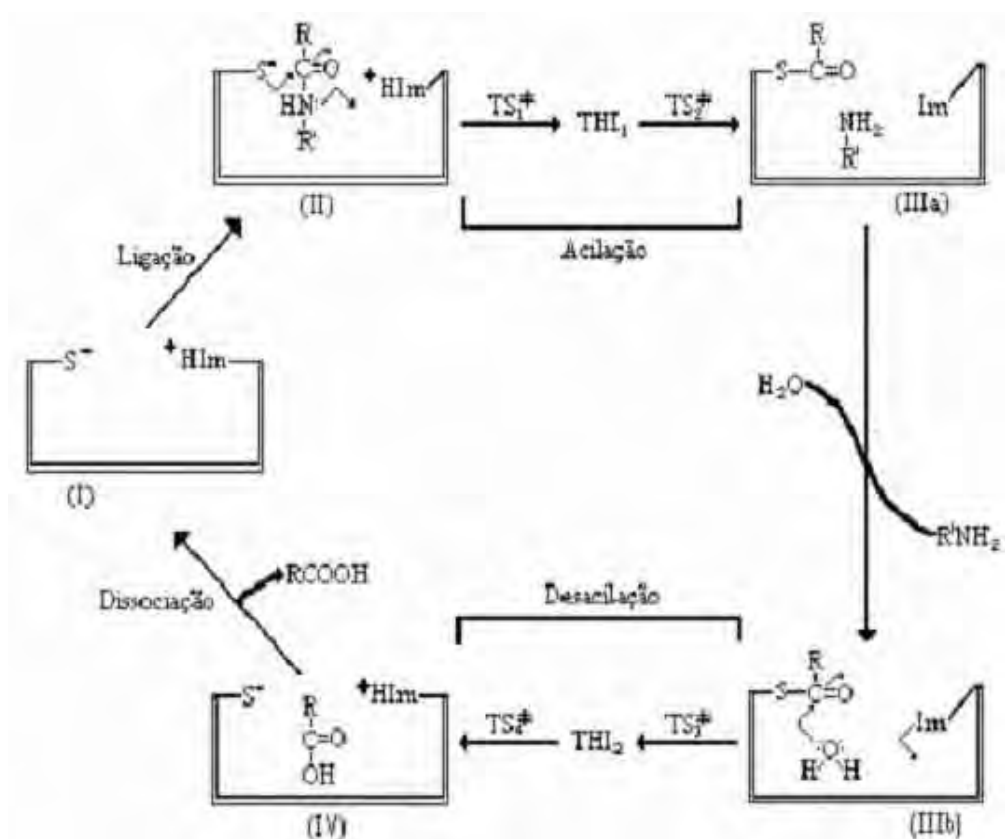


Figura 5. Representação esquemática dos vários passos e supostos intermediários e estados de transição, no caminho da reação para a hidrólise de um substrato amida por uma cisteína-peptidase. Figura extraída e modificada de STORER e MÉNARD, 1994.

O primeiro passo da reação corresponde ao caminho da associação (ou ligação não covalente) da enzima livre (I) com o substrato, para formar o complexo de Michaelis (II). Este passo é seguido pela acilação da enzima (III a), com a formação e liberação do primeiro produto da enzima, a amina $R'NH_2$. No passo seguinte, a acil-enzima (III b), reage com uma molécula de água para formar o segundo produto (passo da desacilação). A liberação deste produto resulta na regeneração da enzima livre (STORER e MÉNARD, 1994).

Acredita-se que muitos passos intermediários e ou estados de transição possam existir ao longo destes caminhos, i.e. baseado em dados experimentais e por analogia com as serino-proteases, sendo proposto que a acilação e desacilação

envolvem a formação de intermediários transitórios tetraédricos (THI_1 e THI_2). Em adição, 4 estados de transição (TS_1 , TS_2 , TS_3 , e TS_4) separam o complexo de Michaelis acil-enzima do complexo enzima-produto dos dois intermediários tetraédricos (STORER e MÉNARD, 1994).

1.8 Família da Papaína (C1).

A mais conhecida das cisteíno-peptidases de plantas é a papaína, isolada da fruta tropical *Carica papaya* (mamão). Esta enzima tem sido bem caracterizada, e foi a primeira cisteíno-peptidase a ter sua estrutura tridimensional resolvida (MÉNARD, 1993).

Esta atenção considerável dedicada a esta enzima deve-se também à sua ampla distribuição e seu importante papel na manutenção de processos biológicos de plantas, tais como a ação contra insetos, e sua contribuição para a compreensão de patologias envolvendo cisteíno-peptidases de mamíferos (MÉNARD, 1993).

Em consequência, muitas das informações disponíveis sobre cisteíno-peptidases foram obtidas dos estudos com papaína (MÉNARD, 1993).

A estrutura tridimensional da papaína foi primeiramente resolvida em $2,8\text{\AA}$ por DRENTH (1968), e depois à altíssima resolução ($1,65\text{\AA}$) por KAMPHUIS (1984).

A papaína é constituída de uma cadeia simples, com 212 resíduos de aminoácidos, e uma massa molecular de 23.406 Da, dobrada formando dois domínios delimitando uma fenda dentro da qual o substrato pode se ligar, (STORER e MÉNARD, 1994).

A molécula da papaína contém ao todo 7 resíduos de cisteína, sendo que 6 destes realizam 3 ligações dissulfeto, enquanto a cisteína-25 (Cys-25) está envolvida no sítio catalítico (LOWE, 1976), (figura 6).

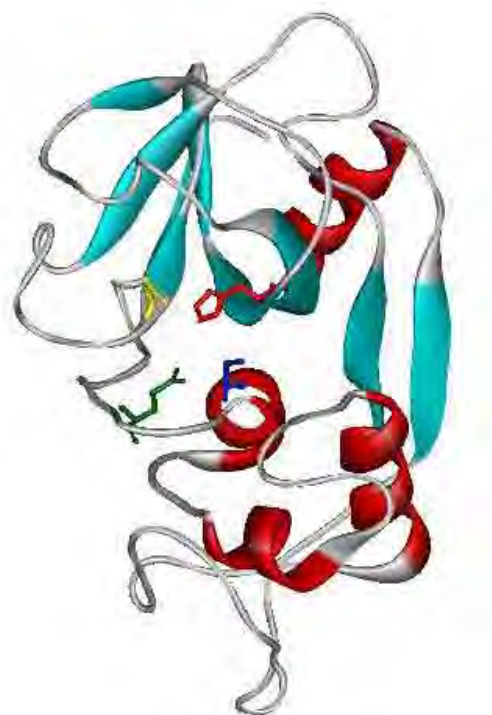


Figura 6. Estrutura da Papaína (PDB ID: 9PAP), Kamphuis et al., 1984. Os resíduos Cys-25 (azul) e Gln-19 (verde) se encontram em um domínio, já os resíduos His-159 (vermelho) e Asn-175 (amarelo), estão no domínio oposto ao da Cys-25. Esta estrutura terciária foi gerada no programa computacional, ViewerLite, através das coordenadas tridimensionais 9PAP, obtidas no *Protein Data Bank*.

1.9 Evolução das Endopeptidases.

A homologia evolutiva das proteases é demonstrada pela similaridade da sequência de aminoácidos, e pela estrutura molecular, revelada pela cristalografia de raios-X (BARRETT, 1994).

A similaridade da sequência de aminoácidos, permite fazer análises estatística, (DAYHOFF et al. 1983). BARRETT (1994), introduziram o termo “Superfamília”,

para descrever o grupo de proteínas que mostram evidências estatísticas de homologia evolutiva.

As Cisteíno-peptidases, são encontradas em bactérias, microrganismos eucarióticos, plantas e animais, divididas em quatro ou mais superfamílias, (BARRETT, 1994).

A Cisteíno-peptidase mais estudada é a papaína do látex da *Carica papaya*. Os dados da sequência de aminoácidos, mostra que as cisteíno-peptidases de outras plantas superiores são membros da superfamília da papaína, como por exemplo as Catepsinas B, H, e L dos lisossomos dos mamíferos (BARRETT, 1994).

Muitos protozoários contêm cisteíno-peptidases com um peso molecular de 25KDa, e outras propriedades consistentes com a papaína, de forma que é concebível que a primeira cisteíno-peptidases da superfamília da papaína tenha funcionado no vacúolo digestivo de um protozoário (BARRETT, 1994).

As Cisteíno-peptidases, que contêm um resíduo essencial de cisteína no seu sítio catalítico, diferem na especificidade de substratos e outras propriedades enzimáticas por divergências evolutivas. Por exemplo, entre as catepsinas, a catepsina B possui atividade de endopeptidase e dipeptidil peptidase; a catepsina H atividade de endopeptidase e aminopeptidase; a catepsina L tem alta atividade de endopeptidase quando os substratos são proteínas nativas; o mesmo é notado para a catepsina S (WIEDERANDERS, 1992).

De acordo com KENNETH et al.(1996), todas as Cisteíno-peptidases requerem para o seu correto enovelamento uma longa pró-região, que pode compreender acima de 30% do total da massa molecular da enzima madura. Esta pró-região provavelmente tem uma dupla função, como um modelo de enovelamento e um inibidor intrínscio, prevenindo a ativação ectópica da proteína recém sintetizada. Evidências de ambas as funções têm demonstrado que a pró-região da

Serino-peptidases Subtilisina age como um co-fator essencial durante o enovelamento da enzima.

Todas as cisteíno-peptidases são inicialmente sintetizadas com um precursor no N-terminal, um pré-domínio de aproximadamente 120 resíduos de aminoácidos (OKOMOTO et al. 1999).

O pré-domínio é um inibidor das peptidases e é essencial no correto enovelamento da proteína. O processamento da pró-enzima ocorre por auto catálise, nos compartimentos pós-golgi do sistema de secreção (OKOMOTO et al. 1999).

A pró-enzima intacta não tem sido isolada de tecidos de plantas, e a idéia é que a enzima é ativada por remoção proteolítica da pró-região durante ou exatamente depois da translocação. Detalhes dos passos proteolíticos envolvidos neste processamento são entretanto desconhecidos (KENNETH et al. 1996).

Em proteases intracelulares este processamento ocorre no compartimento lítico (Lisossomos ou Vacúolos), e em proteases extracelulares o processamento ocorre durante a secreção.

1.10 Funções e localizações das peptidases nas plantas.

As peptidases de plantas têm motivado estudos bioquímicos de longa data. Essas enzimas estão envolvidas na reutilização dos constituintes das proteínas (os aminoácidos), e em processos fundamentais das plantas, tais como:

- germinação, proteínas são mobilizadas para estocagem de reservas;
- crescimento e diferenciação;
- movimentação de proteínas existentes e sua substituição por novas, sendo a chave para a adaptação ao meio ambiente;
- senescência, proteínas são quebradas em pequenos peptídeos e aminoácidos, sendo estocados para a próxima germinação, (BOLLER, 1986).
- remoção de proteínas “anormais” mal enoveladas, e mal endereçadas;

- suplementação de aminoácidos necessária para sintetizar novas proteínas;
- contribuição para a maturação de zimogênios e hormônios peptídicos, por clivagem controlada;
- controle do metabolismo e homeostase pela redução da abundância de enzimas chaves e proteínas regulatórias;
- clivagem de sinais alvos das proteínas antes das suas interações finais com as organelas, (PALMA et al., 2002).

Este mecanismo molecular faz parte do mais sofisticado processo global relatado para o crescimento e desenvolvimento das plantas, assim o papel das peptidases em muitos estágios do desenvolvimento, como: morfogênese e biogênese celular, senescência, e morte celular programada.

A presença de atividade proteolítica tem sido relatada em diferentes locais da célula, tais como, vacúolos, cloroplastos, parede celular, microssomos, mitocôndrias, citosol e aparelho de Golgi, (PALMA et al., 2002 e DISTEFANO, 1997).

A proteólise é um processo de fundamental importância durante toda a vida da planta, e esta importância aumenta durante a senescência, quando as reservas de nitrogênio oriundas de proteínas endógenas são mobilizadas para partes reprodutivas, como sementes e frutos (DISTEFANO, 1997).

As peptidases na sua maioria estão nos vacúolos, que são responsáveis pela degradação de proteínas nos tecidos da planta, e também estão presentes em outros compartimentos, tais como: cloroplastos, microssomos, mitocôndrias, citosol e complexo de Golgi (DISTEFANO, 1997), (figura 7).

As ações das peptidases são controladas por mecanismos que envolvem controle gênico, produção de zimogênios, ativação e inibição enzimática (GARCÍA-CARREÑO e DEL TORO, 1997).

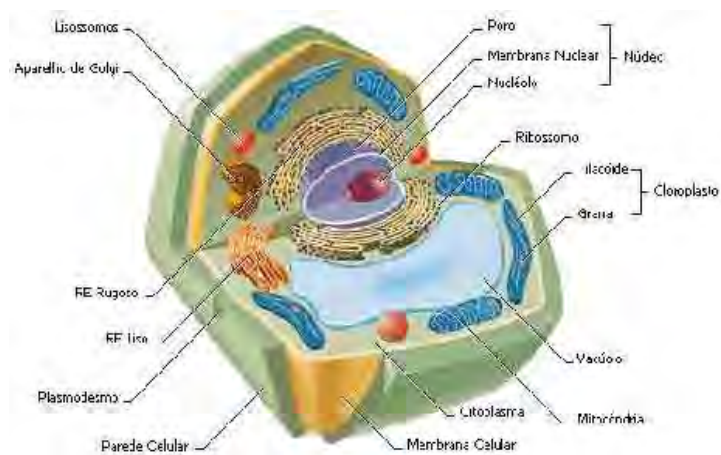


Figura 7. Representação de uma célula vegetal, onde podemos observar que o Vacúolo é a maior organela da célula vegetal.

1.11. Cisteíno-peptidases do Abacaxi.

As enzimas do abacaxi (*Ananas comosus*) são conhecidas como bromelinas. O nome foi originalmente aplicado para uma peptidase de um membro da família Bromeliaceae. Frações com atividades proteolíticas estão presentes no caule ou talo da fruta (*stem bromelain*) e também na polpa (*fruit bromelain*) (ROWAN e BUTTLE, 1994).

Ainda de acordo com os mesmos autores acima, por algum tempo, estas duas frações da enzima foram designadas com números sistemáticos separados, embora mais recentemente elas tenham sido agrupadas. É evidente que existem consideráveis confusões com relação a estas duas enzimas, se tratam de proteínas distintas, ou duas formas representativas de uma mesma enzima. Tem sido relatadas acima de seis diferentes componentes na *stem bromelain* e dois componentes para a *fruit bromelain*, possivelmente dependendo da localização geográfica (ROWAN et al. 1994).

Duas cisteíno-peptidases adicionais: a ananaína e comosaína, foram detectadas somente no caule ou talo do abacaxi. A sequência de aminoácidos da bromelina do caule foi determinada e esta enzima mostrou ser um membro da família da papaína.

A identificação das enzimas do abacaxi necessitou uma reclassificação, bromelina do caule: E.C. 3.4.22.32, bromelina do fruto E.C. 3.4.22.33. Ainda dentro deste número, estão incluídas a pinguinaina, a principal cisteíno endopeptidase da *Bromelain pinguin* e a ananaína, que é classificada com o E.C. 3.4.22.31 (ROWAN e BUTTLE, 1994).

1.12 Ocorrência e Caracterização.

No abacaxi, a alta atividade proteolítica não é observada somente na polpa mas também no talo do fruto e nas folhas. As proteases do talo do abacaxi são preparadas em escala comercial, possuindo numerosas aplicações técnicas e médicas (BOLLER, 1986).

Todas as proteases do abacaxi são tipicamente cisteíno-peptidases. A Bromelina do talo consiste de 4 componentes similares, todos são básicos, glicoproteínas, e com massa molecular por volta de 28KDa. A atividade proteolítica das folhas apresenta duas isoformas: uma com peso molecular de 30KDa e pH ótimo de 8,6, e a segunda com uma massa molecular aproximadamente de 21KDa e pH ótimo de 6,3 (BOLLER, 1986).

O extrato bruto do talo do abacaxi também contém inibidores das Bromelinas este é um caso raro, onde um inibidor de proteases inibe a protease da própria planta. O inibidor possui alta afinidade pelo sítio catalítico da bromelina, com um $K_i = 10^{-7}M$, enquanto que para a ficina e papaína de $K_i = 10^{-5}M$. A função deste inibidor não é bem conhecida. Em vista da localização vacuolar das peptidases,

especula-se que o inibidor seja um protetor das proteínas contra as peptidases que acidentalmente possam ser liberadas do vacúolo (BOLLER, 1986).

1.13 Localização.

O abacaxi tem peptidases nas folhas, localizadas nos vacúolos de células dos mesófilos (BOLLER, 1986).

1.14 Possível Função (BOLLER, 1986).

Não há uma explicação para a presença da alta atividade proteolítica, que não é uma característica geral das plantas.

A Bromelina do abacaxi é prejudicial para a pele do trabalhador, causando dermatoses e quase completa obliteração das digitais, assim como a seiva da *Agave* é acentuadamente irritante para a pele, e as peptidases presentes tem sido apontadas como a causa da irritação.

Os frutos da *Bromelia pinguin* contêm alta atividade proteolítica e agulhas pontiagudas de oxalato de cálcio, que desenvolvem úlceras nos dedos, assim como as folhas das Bromeliaceae são ricas em cristais de oxalato de cálcio, e a combinação destes com as proteases seria uma efetiva defesa contra certos herbívoros.

1.15 Aplicações das peptidases do abacaxi.

Segundo MAURER, (2001), uma variedade de experimentos clínicos *in vitro* e *in vivo*, principalmente com roedores, sobre as propriedades da Bromelina, podem ser resumidas a seguir:

- Prevenção da formação de edema e atua na redução de edemas existentes;
- Redução do nível de fibrinogênio do sangue;
- Promoção de fibrinólise;
- Ativação da plasmina;

- Aumento do tempo parcial da protrombina e tromboplastina, (relativamente depois de altas doses);
- Prevenção da agregação plaquetária no sangue;
- Prevenção da adesão de plaquetas a células endoteliais;
- Redução do nível de plasmacinas do sangue;
- Ação como agente antiinflamatório;
- Indução da secreção de interleucina (il)-1, il-6, il-8 e de fator de necrose tumoral (TNF)- α por monócitos e granulócitos;
- Prevenção a formação de metástase em modelos com ratos.

Muitos dos efeitos da Bromelina são resultados da sua capacidade de alterar e modular distintas estruturas da superfície celular pela clivagem de peptídeos, assim essa enzima medeia modificações em moléculas de adesão de plaquetas em células normais e de tumores malignos, inibindo a sua ação (MAURER, 2001).

2. OBJETIVOS.

As proteases apresentam um papel importante na fisiologia das células vegetais, como por exemplo a degradação de proteínas “velha” para a obtenção de Nitrogênio para a germinação das sementes. Para melhor compreensão da ação destas proteases vegetais, tivemos os seguintes objetivos:

- 1º) Realizar as purificações das enzimas envolvidas Fastuosaina, (extraída do fruto do gravatá), Bromelina do Talo e do Fruto, (extraídas do fruto do abacaxi), e da Papaína, (adquirida da Sigma);
- 2º) Realizar a caracterização funcional das enzimas com relação a: pH, temperatura, força iônica, uréia e mapeamento dos subsítios;
- 3º) Realizar a detecção e a determinação da composição dos monossacarídeos que compõem as enzimas Fastuosaina, Bromelinas do Talo e do Fruto e a Papaína;
- 4º) Realizar o seqüenciamento do gene codificador da enzima Fastuosaina extraída do fruto do gravatá;
- 5º) Obter a seqüência de aminoácidos que constitui esta enzima, através dos resultados do seqüenciamento do gene;
- 6º) Realizar a modelagem molecular para a obtenção da estrutura tridimensional das enzimas Fastuosaina, Bromelina do Talo e a Ananaína (Bromelina do Fruto), todas com e sem inibidores (E-64 e E-64-c), e a Fastuosaina na sua forma pró-enzima;
- 7º) Realizar a clonagem e a expressão da Fastuosaina em *E. coli*, e a caracterização.

3. MATERIAL E MÉTODOS.

O fluxograma da figura 8 resume o item de material e métodos.

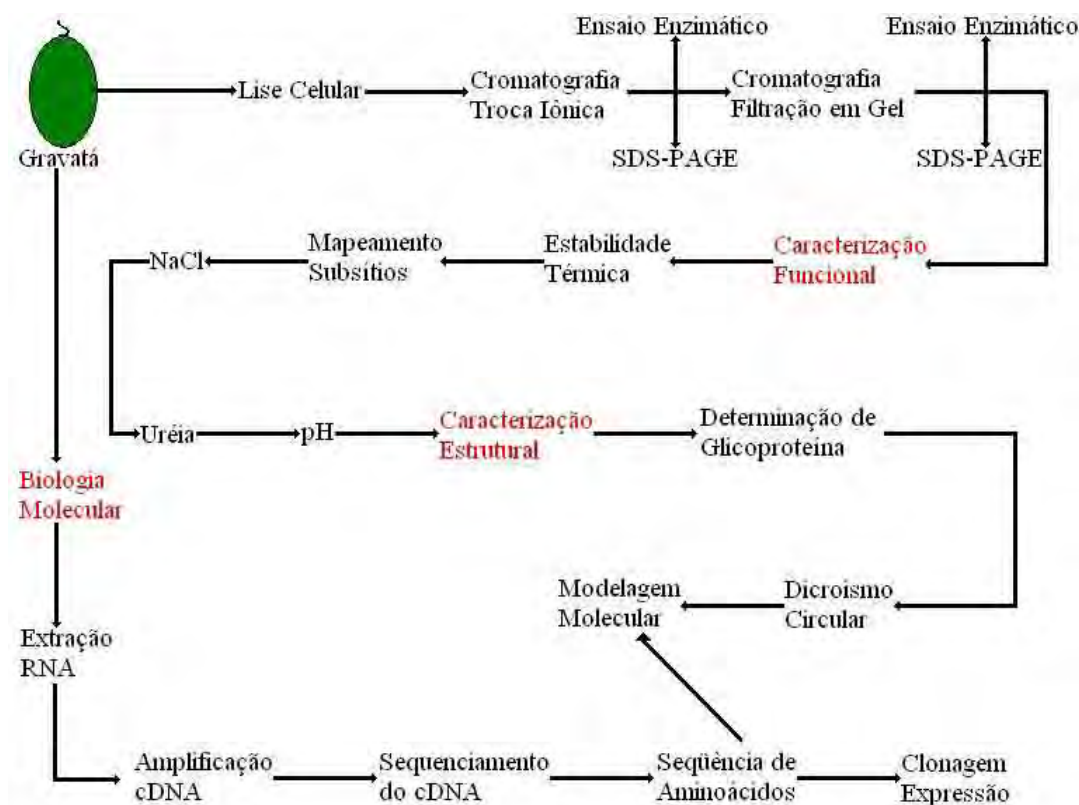


Figura 8. Fluxograma resumindo o material e métodos.

3.1 Identificação, coleta e estocagem dos frutos.

A espécie do material biológico foi identificada pelo botânico especialista em bromeliáceas Dr. Raulino Reitz, de Itapema, Santa Catarina, sendo classificada como *Bromelia fastuosa*, (ROMANELLI et al., 1994).

Os frutos da *Bromelia fastuosa* (gravatá), (Figura 9) foram coletados na fazenda São Marcos, que se localiza nas margens da rodovia vicinal que liga São José do Rio Preto ao bairro Vila Azul.

A época de coleta se dá no início do mês de Dezembro e vai até o fim do mês de Fevereiro.

Nós optamos por trabalhar com os frutos verdes, porque os frutos maduros apodrecem rapidamente na planta, colocando assim em risco a obtenção do material para estudo.



Figura 9. Foto de um cacho da *Bromelia fastuosa* (gravatá) seus frutos verdes.

Após a coleta dos frutos, estes foram levados para o laboratório, no qual foram colocados em um tanque com água a uma temperatura por volta de 10 a 15°C. A seguir os frutos foram selecionados, lavados, embalados em sacos plásticos marcados com a data da coleta, e estocados em freezer a -20°C, até o momento da sua utilização para a realização dos experimentos.

3.2 Obtenção do extrato bruto da fastuosaina.

A extração da enzima foi feita descascando os frutos e retirando as sementes e fibras, utilizando somente as polpas, que foram colocadas em um liquidificador juntamente com o tampão de extração: acetato 70mM pH 4,5 com 5mM de EDTA

(gelado). Este extrato bruto foi filtrado através de gaze e em seguida por um coador de malha fina.

Imediatamente, este filtrado foi transferido para tubos Falcon de 50 mL e centrifugados a 9.000 xg por 40 minutos a uma temperatura de aproximadamente 1°C, em centrífuga CR3i (Jouan) para a clarificação da amostra.

3.3 Cromatografias de troca iônica da fastuosaina, bromelina da polpa e do talo do abacaxi¹.

A separação em cromatografia de troca iônica baseia-se na adsorção reversível de moléculas do soluto carregadas a grupos iônicos de cargas opostas ligados covalentemente a um suporte. Esta técnica de purificação de proteínas depende basicamente de quatro passos: equilíbrio da resina em pH e condutividade, adsorção das proteínas pela resina, eluição das proteínas, e regeneração da resina. A amostra e a resina devem ser completamente equilibradas com o tampão acetato 70mM pH 4,5 com 5mM de EDTA antes da cromatografia.

Na realização da cromatografia de troca iônica da fastuosaina, da bromelina da polpa e do talo do abacaxi, foi utilizada a resina catiônica SP-Sepharose Fast Flow (Pharmacia) montada em uma coluna com as seguintes dimensões: 20cm x 1,5cm (Bio-Rad).

A resina foi inicialmente equilibrada com o tampão acetato 70mM pH 4,5 com 5mM de EDTA, checando-se o pH e a condutividade do tampão que eluía da coluna. Após alcançar o equilíbrio, o sobrenadante foi aplicada na coluna com um fluxo de 0,5mL/min, isto para garantir que as enzimas ligassem na resina eficientemente.

¹ De forma a compartilharmos a nomenclatura usada para as bromelinas, a bromelina da polpa será chamada de bromelina do fruto e a bromelina do talo do abacaxi de bromelina do talo.

Em seguida, foi estabelecido um gradiente salino do tipo convexo com o tampão acetato 70mM pH 4,5 com 5mM de EDTA, com variação de força iônica de 0M a 2M de NaCl.

O volume de cada tampão do gradiente foi de 2,5 vezes o volume da resina, com fluxo de 0,5mL/min, mantido com auxílio de uma bomba peristáltica P-1 (Pharmacia), sendo coletadas frações com volumes de 5ml em tubos de ensaio, utilizando-se para isto um coletor de frações (Incibrás). Todo o procedimento foi executado a 4°C, em refrigerador com porta de vidro.

3.4 Cromatografias de filtração em gel, da fastuosaina e da bromelina do fruto e bromelina do talo.

O princípio da cromatografia de filtração em gel, é a separação de moléculas em função das massas moleculares. As matrizes (gel) são dotadas de esferas com poros que variam de tamanho, de acordo com o tipo da resina.

Para a realização da cromatografia de filtração em gel foi utilizada a resina Sephadex G-50 média (Pharmacia), e uma coluna com 70x1,5cm (Bio-Rad).

Antes da aplicação da amostra da fastuosaina e da bromelinas do fruto e do talo, a resina foi equilibrada, usando-se 1,5 vezes o volume da resina com o tampão acetato 70mM pH 4,5 com 5mM EDTA e 70mM NaCl.

A amostra de proteína foi aplicada num volume correspondente de 3% em relação ao volume da resina, (o volume da amostra nunca pode exceder os 5% do volume da resina contido na coluna). A eluição das enzimas foram realizadas com o mesmo tampão descrito acima. O fluxo de eluição foi de 0,5ml/min, coletando-se o eluente conforme descrito anteriormente na cromatografia de troca iônica.

Todo o procedimento foi executado a 4°C, em refrigerador com porta de vidro.

3.5 Obtenção dos Frutos do Abacaxi.

Os frutos de *Ananas comosus*, foram obtidos diretamente de um produtor na região de Frutal, estado de Minas Gerais; estes frutos são do cultivar *smooth cayenne* (abacaxi havaiano ou abacaxi amarelo), figura 10.



Figura 10. Foto de um abacaxi (*Ananas comosus*) variedade *smooth cayenne*, utilizado para a realização dos experimentos.

3.6 Extração das enzimas bromelina do fruto e do talo.

Os frutos do abacaxi se encontravam no estágio de amadurecimento (parcialmente maduros), sendo descascados e em seguida separada a parte do fruto (polpa) da parte do talo, já que queríamos analisar separadamente a enzima do fruto e do talo.

3.6.1 Extração da enzima bromelina do fruto e do talo.

Após a separação das partes do abacaxi, a parte selecionada (polpa ou talo), foi colocada em um liquidificador com 100mL de tampão acetato 70mM pH 4,50 gelado, e em seguida batido por cerca de 5 minutos.

Este extrato bruto foi filtrado através de uma gaze e também por um coador de malha bem fina. O filtrado foi submetido a clarificação por centrifugação de 8000 xg por 60 minutos a 0°C.

3.7 Obtenção da papaína.

A enzima papaína foi adquirida da Sigma, sendo necessário apenas solubiliza-lá no tampão acetato 70mM pH 4,5 com 5mM de EDTA, e depois submetida a uma cromatografia de troca iônica e filtração em gel, como descrito anteriormente para a fastuosaina.

3.8 Ensaio enzimático.

O ensaio da atividade proteolítica seguiu o protocolo de SARATH et al. (1996), com algumas modificações.

O princípio deste ensaio baseia-se na hidrólise de uma proteína (caseína, hemoglobina ou gelatina) que serve como substrato para a enzima. A hidrólise libera peptídeos, contendo quantidades variáveis dos aminoácidos com grupos aromáticos (Phe, Tyr, Trp), os quais apresentam absorção de luz no comprimento de onda de 280nm. As proteínas são precipitadas pela adição de ácido tricloroacético (TCA), e após centrifugação, o sobrenadante contendo aminoácidos aromáticos livres ou pequenos peptídeos, apresenta absorção de luz UV proporcional à atividade da enzima.

Os volumes de reagentes e condições do ensaio padrão são mostrados na tabela abaixo:

Ensaio Enzimático e Soluções Utilizadas.

Soluções Utilizadas	Tubo Teste	Tubo Branco
solução de enzima	50µL	50µL
β-mercaptoetanol 100mM(estoque)	15µL	15µL
Pré-Incubar por 5 minutos a 37°C		
tampão fosfato pH 7,0	50µL	50µL
Caseína 1%	800µL	800µL*
Incubar por 20 minutos a 37°C		
TCA 10%	200µL	200µL

*Imediatamente após a adição da caseína 1% era adicionado o TCA a 10% para interromper a reação enzimática.

Após a adição do TCA as reações tanto o tubo teste quanto o tubo branco, foram centrifugados por 20 minutos a aproximadamente 5.000 xg em uma micro-centrífuga de eppendorff MA (Marconi).

Os sobrenadantes foram submetidos a leitura da absorbância em 280nm em cubetas Cuvette (Eppendorf) utilizando um espectrofotômetro de duplo feixe Cary Scan 100 (Varian).

Foi realizada uma curva de calibração com tirosina, segundo BAEZA et al. (1990), sendo definido que 1U = aumento $Abs_{280} = 1\mu\text{mol Tyr/min}$, nas condições do ensaio, segundo a definição de Unidade de atividade enzimática.

3.9 Métodos de concentração das enzimas proteolíticas.

Após a eluição das enzimas das cromatografias de troca iônica e filtração em gel, e a suas detecções através do ensaio enzimático, as enzimas foram concentradas em concentradores Centriplus-10 (Amicon), em uma centrífuga refrigerada Spin IV (Incibrás) a 3.000 xg a aproximadamente 4°C.

Também foi utilizada uma SpeedVac SC 110 (Savant) acompanhada de um *Refrigerated Vapor Trap RVT 4104 -100°C* (Savant), para concentrar as enzimas, utilizando-se tubos de ensaio siliconizados, para que não ocorresse a aderência da enzima à parede do tubo de vidro.

3.10 Eletroforese desnaturante em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE), para a determinação da pureza da enzima fastuosaina.

Eletroforese é o processo de movimento de moléculas carregadas, pela aplicação de um campo elétrico. As moléculas se movem com uma velocidade que depende da sua carga, forma e tamanho (PROTEIN electrophoresis application guide, 1994).

Na eletroforese desnaturante com dodecil sulfato sódio (SDS), a separação e migração de uma proteína não é determinada pela carga elétrica intrínseca da proteína, mas sim pela sua massa molecular, visto que o SDS é um detergente aniônico, que além de desnaturar as proteínas, as envolve com cargas negativas (VOET e VOET, 1995).

Análises eletroforéticas para certificarmos a pureza da fastuosaina, bromelinas do talo e fruto, e da papaína, foram realizadas utilizando-se SDS-PAGE a 15%, preparado em uma mini cuba Mini VE (Pharmacia). Foi utilizada uma fonte EPS-3501 (Pharmacia), aplicando uma voltagem de 100V, por aproximadamente 2 horas e 30 minutos.

A mistura de padrões de massa molecular que utilizamos foi o LMW Electrophoresis Calibration Kit código 17-0446-01, (Pharmacia), com as seguintes proteínas e suas respectivas massas moleculares:

Fosforilase b	97KDa
Albumina	66KDa
Ovoalbumina	45KDa

Anidrase Carbônica	30KDa
Inibidor de Tripsina	20,1KDa
α -Lactoalbumina	14,4KDa

As proteínas foram visualizadas nos géis após coloração com Nitrato de Prata de acordo com o protocolo de SEE e JACKOWSKI (1989).

3.11 Secagem de gel de Poliacrilamida.

Após a corrida, a fixação e a coloração do gel SDS-PAGE, foi realizada a secagem do gel para conservação segundo o método descrito por CERON et al. (1992).

3.12 SÍNTESE DE PEPTÍDEOS.

3.12.1 Peptídeos com Fluorescência Apagada.

Foram sintetizados substratos fluorgênicos com supressão interna de fluorescência, (*quenching*), cuja utilidade no estudo da especificidade de proteases está amplamente comprovada CHAGAS et al. (1991); HIRATA et al. (1995). Esses substratos contém um grupo fluorescente, ácido orto-aminobenzóico (Abz), ligado normalmente à porção amino-terminal de um peptídeo que contém o sítio de hidrólise reconhecido pela enzima. Na porção carboxi-terminal é introduzido um supressor da fluorescência, etilenodiamino-dinitro-fenil (EDDnp). Outros substratos contendo como supressor nitro-tirosina na penúltima posição carboxi-terminal, tendo ácido aspártico como “*linker*” para síntese em fase sólida, também foram utilizados (MELDAL et al., 1998). Enquanto a cadeia peptídica estiver íntegra e estes dois grupos (fluorescente Abz e supressor de fluorescência EDDnp) estiverem relativamente próximos, a fluorescência do composto será baixa. A partir do momento em que estes grupos são afastados em virtude de uma clivagem enzimática em algum ponto da cadeia, a fluorescência da solução aumentará várias vezes (figura 11).

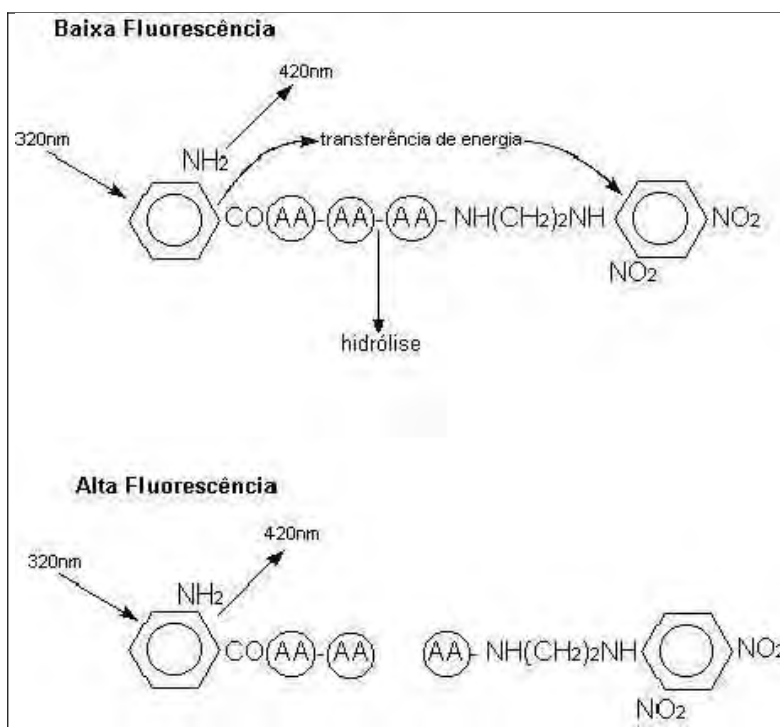


Figura 11. Esquema de um peptídeo de fluorescência apagada, mostrando na extremidade aminoterminal o grupo Abz (fluorescente) e na extremidade carboxiterminal o grupo EDDnp (apagador). Quando o peptídeo não sofre a hidrólise ocorre a transferência de energia para o Eddnp, e quando ele sofre a hidrólise ocorre a liberação de energia (fluorescência).

Os substrato utilizados foram sintetizados no Laboratório de Biofísica da Universidade Federal de São Paulo/Escola Paulista de Medicina (UNIFESP/EPM) do Instituto de Farmacologia (InFar), sob a responsabilidade da Prof. Dra. Maria Juliano e do Prof. Dr. Luiz Juliano.

3.13 Titulação da papaína.

A amostra de Papaína foi ativada em tampão fosfato de sódio 100mM pH 6,3 com 100mM de NaCl 10mM de EDTA e contendo 5mM de DTT, por 5 minutos em cubeta de quartzo de 1 mL, fixada na cela do fluorímetro, termostatizado a 37°C. Em seguida foi adicionado o substrato Abz-KLRFSKQ-EDDnp, para o monitoramento da atividade da papaína. Os dados obtidos de velocidade (UAF/min)

nas diferentes concentrações de E-64 foram analisados por meio de regressão linear pelo programa GRAFIT 5.0, e calculada a concentração de papaína por extrapolação da concentração do inibidor. O inibidor E-64 foi adicionado em concentrações crescentes e foi deixado em incubação por 5 minutos. Em seguida, foram realizadas as leituras de fluorescência para medir a atividade remanescente.

3.13.1 Titulação do inibidor Cistatina.

Amostra da papaína previamente titulada (com o E-64) foi incubada em tampão fosfato de sódio 100mM, pH 6,3, com 100mM de NaCl 10mM de EDTA e 5mM de DTT a 37°C em cubeta de quartzo de 1mL por 5 minutos, fixada na cela do fluorímetro termostatizado. Após esse tempo foi acrescentado Z-FR-MCA (15µM na cubeta) para o monitoramento da atividade residual da papaína para cada volume de cistatina. A cada amostra foram adicionado volumes crescentes de cistatina e incubada por 5 minutos. Os resultados de velocidade (UAF/min.) pelo volume crescente de cistatina foram analisados por regressão linear pelo programa GRAFIT 5.0, e determinado a concentração da cistatina capaz de inibir 100% da atividade da papaína.

3.13.2 Titulação da fastuosaina e das bromelinas do talo e do fruto.

Amostra da fastuosaina, e bromelina do talo e do fruto foram ativadas em tampão fosfato de sódio 100mM pH 7,0 com 100mM de NaCl e 10mM de EDTA, contendo 5mM de DTT a 37°C em cubeta de quartzo de 1mL. Foram adicionadas concentrações crescentes de cistatina na cubeta, e o perfil inibitório foi determinado por monitoramento da atividade residual da fastuosaina, bromelina do talo e do fruto sobre o substrato Abz-KLRFSKQ-EDDnp (8,45µM final na cubeta).

Os dados obtidos foram submetidos a análise por regressão linear conforme antes citado, e assim obtida a concentração de cada enzima.

3.14 Titulação dos Substratos Abz-Peptidil-EDDnp.

Para a titulação de cada um dos substratos Abz-peptidil-EDDnp, foi efetuado cinco diluições em água, as quais foram submetidas a leitura da absorbância $\lambda=365\text{nm}$ em espectrofotômetro modelo U-3210 (Hitachi, Japão), utilizando cubetas de quartzo de 1mL. Os valores obtidos foram analisados por regressão linear pelo programa GRAFIT, obtendo-se uma reta (absorbância x volume de substrato) cujo coeficiente angular foi utilizado para a determinação da concentração do substrato em micromolar (μM), através da equação $[\text{SUBSTRATO}] = \text{COEFICIENTE ANGULAR} / \epsilon$, sendo $\epsilon = 17300\text{M}^{-1}$, o coeficiente de extinção do grupo EDDnp.

3.14.1 Padronização do Fluorímetro para o Grupo Abz (Ácido o-aminobenzóico).

Para a padronização do fluorímetro modelo F-2000 (Hitachi, Japão), foi realizado inicialmente a hidrólise total por tripsina (20nM) de quatro concentrações (0,25 a 1,0 μM) do substrato Abz-KLRFSKQ-EDDnp. Foi efetuada a medição da fluorescência desses hidrolisados usando $\lambda_{\text{em}} = 420\text{nm}$ e $\lambda_{\text{ex}} = 320\text{nm}$. Os valores obtidos foram analisados por regressão linear pelo programa GRAFIT, obtendo-se uma reta (fluorescência x concentração) cujo coeficiente angular corresponde a constante do aparelho em UAF/ μM . Este valor foi utilizado para a conversão da velocidade de hidrólise em UAF/min para M/min.

3.14.2 Padronização do Fluorímetro para Z-FR-MCA.

Diferentes concentrações do substrato Z-FR-MCA (0,01 a 0,7 μM), foram submetidas a hidrólise total por cruzaína (~10nM) e efetuada a leitura da fluorescência (UAF) nos $\lambda_{\text{ex}} = 360\text{nm}$ e $\lambda_{\text{em}} = 480\text{nm}$. Os valores obtidos foram analisados por regressão linear pelo programa GRAFIT 5.0 obtendo-se uma reta em

UAF/ μ M. Este valor foi utilizado para a conversão da velocidade de hidrólise em UAF/min para M/min.

3.15 Cinética Enzimática.

As medidas de cinética enzimática foram realizadas no laboratório do Prof. Dr. Luiz Juliano Neto (co-orientador do projeto) da UNIFESP/EMP, do Departamento de Biofísica.

Para tais experimentos foi utilizado o tampão fosfato de sódio 100mM pH 7,0 com 100mM de NaCl e 10mM de EDTA e adicionado DTT 5mM (concentração final) para a ativação das enzimas fastuosaina, papaína e bromelina do talo e do fruto, a 37°C.

A hidrólise dos substratos fluorogênicos foi monitorada utilizando um espectrofluorímetro modelo F-2000 (Hitachi, Japão), com cela termostatizada à 37°C e também com agitação magnética, para manter constante a homogeneização do substrato. Os comprimentos de onda foram ajustados para $\lambda_{em} = 420\text{nm}$ e $\lambda_{ex} = 320\text{nm}$. Foram utilizadas cubetas de quartzo com caminho ótico de 10mm com volume final de 1mL. A solução de substrato foi mantida no compartimento termostatizado durante 5 minutos antes da adição da enzima e a fluorescência monitorada. Após a adição da solução da enzima, a variação linear da fluorescência por unidade de tempo foi convertida em nanomoles de substrato hidrolisado por minuto, baseado na curva de fluorescência da solução do peptídeo com concentração conhecida antes e após hidrólise total.

As constantes cinéticas foram determinadas a partir das velocidades iniciais de hidrólise, (< 10% da hidrólise total, determinados através da extrapolação da fluorescência máxima atingível para cada concentração de substrato) utilizando regressão não linear, usando como modelo a equação descrita por Michaelis-Menten, no programa GRAFIT 5.0 LEATHERBARROW, (1992).

3.16 Determinação da curva de pH ótimo das enzimas fastuosaina, papaína e bromelinas do talo e do fruto.

Os experimentos para a determinação do pH ótimo foram realizados com os tampões citrato/fosfato 100mM contendo 10mM de EDTA, com variação de pH de 3 a 7, e Tris/HCl 100mM contendo 10mM de EDTA, com variação de pH de 7 a 9.

As enzimas fastuosaina, papaína e bromelinas do talo e do fruto, foram pré-incubadas por 5 min a 37°C com 5mM de DTT. O substrato utilizado para este experimento foi o Abz-KLRFSKQ-EDDnp.

Os resultados foram obtidos através da realização de cinéticas de pseudo-primeira ordem, onde se obtém a constante catalítica (K_{cat}/K_M).

3.17 Determinação do efeito do NaCl, sobre a hidrólise do substrato Abz-KLRFSKQ-EDDnp, para as enzimas fastuosaina, papaína e bromelinas do talo e do fruto.

O efeito do NaCl foi avaliado por adições em diferentes concentrações (0-1M) deste sal no tampão fosfato de sódio 100mM pH 7,0 e 10mM de EDTA.

As enzimas foram pré-incubadas por 5 min. a 37°C com 5mM de DTT para ativação e posterior adição do substrato Abz-KLRFSKQ-EDDnp. Os resultados deste experimento foram obtidos por cinética de pseudo-primeira ordem.

3.18 Efeito do agente desnaturante (uréia), sobre a atividade catalítica das enzimas fastuosaina, papaína e bromelinas do talo e do fruto.

O efeito da uréia sobre a atividade catalítica das enzimas aqui em estudo, foi avaliado por adições crescentes de uréia no tampão fosfato de sódio 100mM pH 7,0 e 10mM de EDTA.

A enzima foi pré-incubada com DTT 5mM a 37°C por 5 min, no tampão citado acima na presença de uréia, ou seja, a enzima no momento da ativação já estava exposta ao agente desnaturante.

Posterior à ativação da enzima, foi adicionado o substrato Abz-KLRFSKQ-EDDnp, aplicando aos experimentos cinética de pseudo-primeira ordem.

OBS. Toda a parte de síntese dos peptídeos, purificação, análise dos aminoácidos, foram realizados no laboratório da Professora Dr^a. Maria Aparecida Juliano, da UNIFESP/EPM do Departamento de Biofísica. As titulações das enzimas e da cistatina, as titulações dos substratos, a calibração do fluorímetro, as cinéticas enzimáticas, e as determinações do pH, força molar e a perda da atividade pela desnaturação por uréia foram realizados no laboratório do Prof. Dr. Luiz Juliano Neto da mesma instituição e do mesmo departamento.

3.19 Efeito da Estabilidade Térmica sobre a Atividade Catalítica das Peptidases.

Foi realizado o experimento do efeito da estabilidade térmica em função do tempo em que as peptidases (fastuosaina, papaína, bromelina do talo e do fruto), foram submetidas as temperaturas de 25, 37, 45, 55 e 65°C, durante os seguintes tempos de incubação 0, 5, 10, 20, 40, 60, 120 e 180 minutos.

Em seguida, estas peptidases foram submetidas ao ensaio enzimático, contendo:

- 50µL das respectivas peptidases
- 20µL β-mercaptoetanol 0,10M
- pré-incubação por 5 minutos a 37°C
- 50µL Tampão fosfato 100mM pH 7,0
- 900µL Caseína a 1%
- incubação de 20 minutos a 37°C
- 200µL TCA a 10%

Para cada tubo teste foi realizado um tubo branco (referência). Estes tubos foram centrifugados por 20 minutos a 10.000 xg, e logo em seguida foi realizado a leitura em 280nm do sobrenadante.

3.20 Modelagem Molecular da fastuosaina e das bromelinas do talo e do fruto.

Para este procedimento contamos com a colaboração do grupo do Prof. Dr. Walter Filgueira de Azevedo Júnior, do departamento de Física, da UNESP, câmpus de São José do Rio Preto.

A modelagem comparativa é o único método que pode predizer uma estrutura tridimensional de uma proteína com precisão e confiança comparáveis às estruturas experimentais de baixa resolução. A precisão do método está em assumir que se há semelhança detectável entre duas seqüências lineares, a semelhança estrutural pode ser assumida. A seguir são feitas considerações gerais para os cinco passos da modelagem comparativa.

Passos da modelagem comparativa:

A modelagem comparativa consiste em cinco passos resumidos na figura 12 e descritos a seguir:

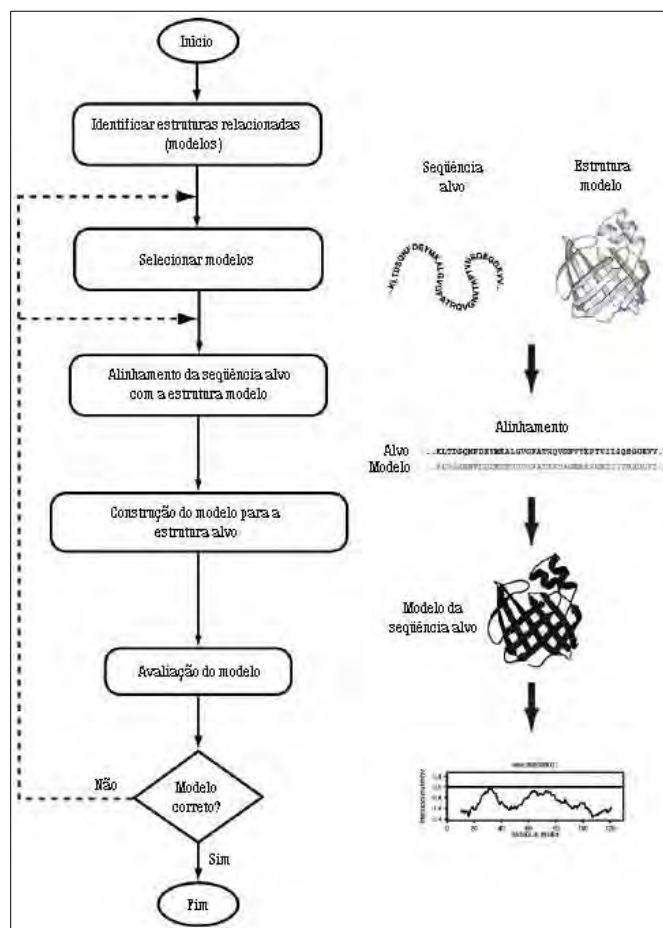


Figura 12. Passos da modelagem molecular comparativa (SANCHEZ e SALI, 1997).

3.20.1 Procura por moldes.

A modelagem inicia-se pela procura por moldes em um banco de dados de estruturas de proteínas (PDB) *Protein Data Bank* (<http://www.rscb.org/pdb>), usando-se como parâmetro de entrada uma seqüência de estrutura não determinada (alvo) para que esta seja comparada com as seqüências mais homólogas de estruturas conhecidas (moldes).

3.20.2 Alinhamento.

Uma vez feita a seleção dos moldes, um método de alinhamento deve ser usado para alinhar o modelo com a seqüência designada. O alinhamento é

relativamente simples de obter-se quando a identidade de sequência do modelo-alvo está acima de 30%. Na maioria dos casos um alinhamento preciso pode ser obtido usando métodos automáticos de alinhamento de sequência-sequência (<http://prodes.toulouse.inra.fr/multalin/multalin.html>), CORPET, (1988).

Se a identidade entre os resíduos é inferior a 30%, o alinhamento geralmente tem falhas extensas. A precisão do alinhamento é o fator que mais afeta a qualidade do modelo resultante.

3.20.3 Seleção dos moldes.

Uma vez obtida uma lista de moldes potenciais usando-se um ou mais métodos de busca, é necessário selecionar os moldes que são apropriados para o problema de modelagem em particular. Normalmente selecionamos os moldes que possuem identidade mais elevada, isto é, porcentagem mais alta de resíduos idênticos e um menor número de “*gaps*”. Entre o alvo e as seqüências-modelo, o melhor é que sempre tomemos o modelo mais próximo e o de melhor resolução para estruturas determinadas por cristalografia.

Por exemplo, se formos construir um complexo proteína-ligante, a escolha do molde que contém um ligante semelhante é provavelmente mais importante que a resolução do modelo. Por outro lado, se o modelo será usado para analisar a geometria do sítio ativo de uma enzima, é preferível usarmos um molde de alta resolução. Não é necessário selecionar só um molde, pois o uso de vários moldes geralmente aumenta a precisão do nosso modelo final De AZEVEDO et al. (2002a, b, c).

3.20.4 Construção do modelo.

Feito o alinhamento, uma variedade de métodos pode ser usada para construirmos um modelo tridimensional da proteína designada. O método, e ainda amplamente usado, faz a modelagem através de montagem de corpo rígido. Este

método constrói o modelo a partir de algumas regiões centrais, dos laços e cadeias laterais que são obtidas ao se dissecar as estruturas relacionadas. Outro o grupo de métodos modela os segmentos emparelhando-os e confiando-se nas posições aproximadas dos átomos conservados nos moldes e calculando as coordenadas de outros átomos. O terceiro grupo de métodos, (método do MODELLER), faz a modelagem satisfazendo as restrições espaciais e usa distâncias geométricas ou técnicas de otimização para satisfazer as restrições espaciais obtidas do alinhamento da sequência designada com o modelo estrutural. As precisões dos métodos são relativamente semelhantes quando adequadamente usados, sendo este método utilizado para a obtenção dos modelos.

3.20.5 Avaliação dos modelos.

Devemos levar em consideração dois tipos de avaliação: (I) avaliação interna de sua consistência intrínseca que verifica se o modelo satisfaz ou não as restrições calculadas, e (II) avaliação externa que confia em informações que não foram usadas no cálculo do modelo.

Uma das formas de localizarmos regiões incertas de um modelo é avaliarmos a estereoquímica (ângulos diedrais e sobreposição de átomo-átomo) do modelo com programas como PROCHECK e WHATCHECK, LASKOWSKI et al. (1994); HOOFT et al. (1996).

Embora erros em estereoquímica são raros e menos informativos do que erros descobertos através da superfície de sobreposição, um agrupamento de erros estereoquímicos no mesmo segmento do modelo pode indicar que a região correspondente também contém outros erros.

Finalmente, uma ferramenta de avaliação importante é o conhecimento experimental sobre a estrutura e função da proteína. Um modelo deve ser consistente

com as observações experimentais, como por exemplo, dados de *cross linking*, ligações dos ligantes, e assim por diante.

Utilizamos o programa MODELLER, SALI & BLUNDELL, (1993) para a modelagem por homologia.

3.20.6 Construção dos moldes gerados para as bromelina do talo e para a ananaina e fastuosaina.

Realizamos a procura por moldes para a bromelina do talo, ananaina e fastuosaina, (proteínas alvo), a partir da sequência primária determinada por RITONJA et al. (1989), no caso da bromelina do talo, no *Protein Data Bank* (PDB). De posse dos resultados fornecidos por esse banco de dados, realizamos a escolha do modelo, onde consideramos os seguintes critérios: 1) a identidade entre a proteína modelo e a proteína alvo, 2) a resolução da proteína modelo, 3) se a proteína modelo era uma enzima pertencente as cisteíno-proteinases. Após a avaliação desses critérios, os moldes que apresentaram maior identidade com a proteína alvo foram 9PAP, 1PE6 e 1AEC, (código do PDB).

Para a outra proteína alvo, a ananaina a qual apresenta sequência primária diferente da bromelina do talo, que também é uma cisteíno-proteinase extraída do talo do abacaxi, obtivemos a sua sequência primária através dos dados publicados por LEE et al. (1997). Então procedemos da mesma forma como descrito acima, no entanto, os modelos utilizados para a modelagem da Ananaina foram 9PAP, 1PE6 e 1AEC.

Para a obtenção da estrutura terciária da fastuosaina foi realizada a modelagem molecular através da dedução da sequência de aminoácidos, obtido a partir da sequência do cDNA.

Os passos da realização da modelagem molecular foram os mesmos descritos acima.

A determinação da identidade foi feita pela contagem das posições dos aminoácidos idênticos das seqüências dos moldes, com as seqüências primárias das proteínas alvos. O alinhamento foi realizado utilizando o programa computacional *on-line* Mult-Alin, CORPET, (1988).

Após o alinhamento das seqüências molde com as seqüências alvo, foi utilizado o programa computacional MODELLER SALI e BLUNDELL, (1993), onde foram gerados 1000 moldes para cada proteína alvo.

Os moldes gerados foram avaliados através do programa computacional PROCHECK, o qual gerou o gráfico de Ramachandran para cada um dos 1000 moldes de cada proteína alvo. No término deste processo, este programa fornece uma listagem com a porcentagem dos resíduos em todas as regiões deste gráfico, e selecionamos o modelo pelo com a melhor qualidade estereoquímica.

Depois de escolhido o melhor modelo, utilizamos o programa computacional OPTIMIZE, para a minimização de energia.

As coordenadas tridimensionais geradas pelo programa MODELLER, para as proteínas alvo, foram utilizadas para a confecção dos elementos de estrutura secundária dessas proteínas. Para isto utilizamos o programa computacional de visualização de macromoléculas *Swiss PDB Viewer* versão 3.7 e *ViwerLite*.

O programa *Swiss PDB Viewer*, também permitiu realizar a sobreposição das estruturas terciárias entre molde e modelo, para medirmos o grau de semelhança das estruturas do molde e o modelo. Esta avaliação foi feita através do valor dos desvios de r.m.s. (*root mean square deviation*, ou desvio médio da raiz quadrada). Este número indica a média da distância entre os carbonos α das proteínas comparadas, quanto menor o valor do r.m.s., maior o grau de semelhança estrutural.

3.20.7 Obtenção da estrutura tridimensional das enzimas fastuosaina, bromelina do talo e do fruto com os inibidores E-64 e E-64-c, através da técnica de modelagem molecular.

Também realizamos a modelagem para as mesmas proteínas alvos citadas anteriormente, no entanto, ligadas com o inibidor E-64 e E-64-c, utilizando como modelo a proteína 1AEC e 1PE6, respectivamente, onde geramos 1000 moldes para cada proteína alvo, seguindo todo o procedimento descrito acima.

O potencial eletrostático da superfície da fastuosaina, bromelina do talo e do fruto, ligadas com os inibidores E-64 e E-64-C, foram obtidos através do programa computacional Pymol (DeLANO 2004).

3.20.8 Modelagem Molecular da fastuosaina com a Pro-região.

Foi realizado a modelagem molecular da fastuosaina com a pro-região

Os passos da realização da modelagem molecular foram os mesmo utilizados a partir do item, 3.22.

O modelo utilizado foi a Pró-caricaina 1 PCI (código de PDB, *Protein Data Bank*).

3.21 Análises de glicoproteínas.

Estes procedimentos foram realizados em colaboração com a Prof. Dra. Maria de Lourdes Corradi Custodio Silva, da Faculdade de Ciências e Tecnologia, do Departamento de Química, Física e Biologia, da UNESP, do Câmpus de Presidente Prudente.

3.21.1 Eletroforese desnaturante em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE), para a determinação da presença de glicoproteínas através da coloração do Reativo de Schiff.

Quando aplicamos proteínas glicosiladas, muitos efeitos especiais são observados no gel SDS-PAGE, estes efeitos podem ser:

- Devido à interferência da(s) cadeia(s) de carboidrato(s), a ligação do SDS às glicoproteínas é menor do que em outras proteínas;
- O ácido siálico contribui muito para a migração das glicoproteínas; em casos extremos, sua remoção resulta em uma significativa redução na migração, dando a falsa aparência de baixo, ou alto peso molecular;
- Devido à micro-heterogenidade, as bandas das glicoproteínas são frequentemente de forma larga, CARLSSON, (1993).

Os métodos mais comuns de coloração para a detecção de proteínas em gel de poliacrilamida são o comassie e o nitrato de prata, freqüentemente resultando uma fraca coloração para glicoproteínas, especialmente para aquelas com alto conteúdo de carboidrato. O método de coloração específico para carboidrato é o ácido periódico de Schiff (PAS), que oferece uma boa escolha para a coloração de glicoproteínas, CARLSSON, (1993).

Foram realizadas análises eletroforéticas para nos certificarmos que a Fastuosaina, a Papaína, e as Bromelinas do Talo e do Fruto e de fato são glicoproteínas. Para isto foi realizado um gel SDS-PAGE a 15%, preparado em uma cuba *Mini VE* (Pharmacia). Foi utilizada uma fonte EPS-3501 (Pharmacia), aplicando uma voltagem de 100V, por aproximadamente 2 horas e 30 minutos.

Utilizamos uma mistura de padrões de massa molecular o *LMW Eletrophoresis Calibration* Kit código 17-0446-01, (Pharmacia), com as seguintes proteínas e suas respectivas massas moleculares:

Fosforilase b	97KDa
Albumina	66KDa
Ovoalbumina	45KDa
Anidrase Carbônica	30KDa
Inibidor de Tripsina	20,1KDa

α -Lactoalbumina

14,4KDa

3.21.2 Análises da composição de monossacarídeos por cromatografia líquida de troca aniônica (HPAEC).

3.21.2.1 Preparo das amostras das enzimas.

As enzimas fastuosaina, papaína e bromelinas do talo e do fruto, foram purificadas de acordo com os métodos citados nos itens 2.4 e 2.5, sendo alquiladas com um excesso molar de ácido iodoacético, NAPPER et al. (1994). A seguir as amostras foram dialisadas utilizando membranas de 14-16KDa, em água ultra pura, (Elga), com três trocas cada, com um volume de 2500mL cada troca, para um volume de amostra próximo de 50mL, deixando por volta de 12 horas cada troca.

Após esta etapa de diálise as amostras foram concentradas em concentradores de 10KDa (Amicon), utilizado uma centrífuga refrigerada (Incibrás). Após a concentração, as amostras das enzimas foram liofilizadas.

Depois de liofilizadas foi retirada uma pequena quantidade (em massa) de cada enzima e pesada. Esta massa foi dissolvida em água ultra pura, e depois foi quantificada a presença de carboidrato pelo método Fenol-sulfúrico, DUBOIS, et al. (1956) e também a quantidade de proteína presente pelo método de Bradford BRADFORD, (1976).

3.21.3 Hidrólise ácida.

Dados da literatura mostram que a hidrólise da bromelina do talo foi feita com Ácido Trifluoroacético (TFA) 4N por 4 horas a 100°C, HARRACH et al. (1995).

A seguir fizemos uma curva de hidrólise para cada enzima, variando o tempo de incubação e a concentração de TFA.

Como sabíamos o teor de carboidrato de cada amostra de enzima pelo método do Fenolsulfúrico, pesamos as massas das enzimas e ressuspendemos em

água deionizada. Fixamos um valor de 35µg de carboidrato e pipetamos o volume de água deionizada correspondente a essa massa, exceto para a Fastuosaina, para a qual utilizamos 22µg. Estes volumes foram colocados em tubos próprios de hidrólise (Bio-Rad), e depois estas amostras foram liofilizadas.

Após a liofilização das amostras das enzimas, foram adicionados 200µL de TFA com concentrações de 2 e 4M.

Todas as amostras foram submetidas a uma atmosfera de Nitrogênio gasoso, para a retirada de oxigênio, evitando assim a oxidação dos monossacarídeos liberados pela hidrólise ácida.

As amostras, com concentração de 2M de TFA, foram colocadas para ser hidrolisadas nos seguintes tempos: 2, 4, 6 e 8 a 100°C, utilizando um bloco de aquecimento. As amostras com 4M de TFA foram colocadas para ser hidrolisadas nos seguintes tempos: 1, 3, 5 e 7, também a 100°C.

Após estes períodos de hidrólise estas amostras foram secadas para a retirada do TFA em uma centrífuga a vácuo (Heto-DNA Plus), depois foram adicionados 300µL de água deionizada e novamente colocado para a secagem. Este procedimento foi repetido por 3 vezes, para a retirada do TFA.

Em seguida, as amostras foram secas e ressuspendidas em água deionizada, para ficar com uma concentração de 1,75µg de carboidrato.

3.21.4 Análises das amostras hidrolisadas no HPAEC.

Métodos para análises em cromatografia líquida de carboidratos têm muitas vezes empregado colunas *silica based amoni-bonded or polymer-based metal loaded cation exchange*, com detecção de índice refrativo (RI) ou (UV) ultravioleta de baixo comprimento de onda (Dionex Ficha técnica nº 20).

Estes métodos de análise requerem atenção para a solubilidade da amostra, concentração da amostra, e no caso das colunas *metal-loaded* de troca catiónica, também é necessário o aquecimento da coluna (Dionex Ficha técnica nº 20).

Em adição, os métodos de detecção RI e UV são sensíveis ao eluente e componentes da matriz da amostra. Isso normalmente exclui o uso de gradientes e muitas vezes requer rigorosa limpeza antes da injeção da amostra (Dionex Ficha técnica nº 20).

Como resultado, uma melhora na técnica de cromatografia conhecida como Cromatografia Aniônica de alto Rendimento (HPAE), foi desenvolvida para separar carboidratos. O acoplamento com detecção amperométrica pulsada (PAD), permite quantificação direta de carboidrato não derivatizado em níveis picomolares, com o mínimo de preparação de amostra e limpeza.

A detecção amperométrica pulsada permite mensurar carboidratos com excelente sinal e baixo ruído com aproximadamente 10 picomol sem requerer a derivatização. Os carboidratos são detectados por medidas de corrente elétrica gerada pela sua oxidação em uma superfície de eletrodo de ouro.

A cromatografia com o HPAE explora a natureza fracamente ácida do carboidrato para dar uma separação de alta seletividade com uso de pH alto e uma resina forte de troca aniônica na fase estacionária.

O HPAE-PAD é extremamente seletivo e específico para carboidratos porque, detecta somente aqueles componentes que contêm grupos funcionais que são oxidáveis na detecção de voltagem empregada (neste caso, sensível para carboidratos e de várias ordens de grandeza maior do que para outras classes de análise); em segundo lugar, componentes das amostras neutros ou catiónicos eluem da matriz no ou próximo do volume de exclusão da coluna. Portanto, mesmo que tais

espécies sejam oxidáveis, elas não interferem usualmente com a análise dos componentes de carboidratos de interesse.

O mecanismo da separação da cromatografia de troca aniônica, embora seja muito usado para análises de carboidratos ácidos e glicopeptídeos, não é comumente utilizado para análise de açúcares neutros.

Entretanto, examinando os valores dos pK_a dos monossacarídeos neutros (tabela 2), mostra que os carboidratos são de fato fracamente ácidos. Em alto pH eles são em menor particularidade ionizados, e assim podem ser separados pelo mecanismo de cromatografia aniônica. Esse uso não é apropriado em colunas clássicas baseadas em sílica, porque suas matrizes se dissolve em pH elevado.

Tabela 2. Constante de dissociação comum de alguns carboidratos em água a 25°C. Tabela extraída de Dionex Ficha técnica nº20.

Carboidrato	pK_a
Fucose	12,03
Manose	12,08
Xilose	12,15
Glucose	12,28
Galactose	12,39
Dulcitol	12,43
Sorbitol	13,6
α -Metil Glucosídeo	13,71

Foi utilizada como padrão, uma mistura contendo 200ng /ml de cada um dos seguintes monossacarídeos: L-Fucose, D(+)-Galactosamina, D(+)-Glicosamina, D-Galactose, D-Glicose e D-Manose.

Em cada injeção foram aplicados 25 μ L de amostras ou de padrão, que foram previamente centrifugados a 4000 xg em uma Microcentrífuga (Beckman).

Os monossacarídeos foram quantificados por cromatografia líquida de alto rendimento consistindo de um sistema Dionex DX 500 e um Detector de Amperometria Integrada (IAD), sendo os cromatogramas registrados em um integrador modelo 4600.

Os monossacarídeos foram separados por uma coluna CarboPac PA10 (4x250mm) com uma pré-coluna PA10 Aminotrep, utilizando para a eluição dos mesmos um gradiente de água deionizada (eluente A) e hidróxido de sódio 200mM (eluente B), o gradiente iniciou com 94% do eluente A e 6% do eluente B (de 0 a 40 minutos, sendo que deste, os 15 minutos iniciais é para equilibrar a coluna) e 100% do eluente B (de 40 a 50 minutos), em ambos os eluentes foi necessário a passagem do gás Hélio para evitar a oxidação pelo oxigênio dos açúcares. O fluxo foi de 1ml/min.

Os carboidratos foram detectados pela ação amperiométrica, trabalhando com uma sensibilidade de 50nA.

3.22 Determinação das estruturas secundárias das enzimas fastuosaina, papaína e bromelina do talo e do fruto.

O princípio básico do Dicroísmo Circular (CD), é indicar os tipos de estruturas relevantes para o estudos do enovelamento e desenovelamento (desnaturação) de proteínas e peptídeos KELLY e PRICE (1997). Isto pode ser analisado tanto para pequenos peptídeos quanto para complexos de multi-domínios e multisubunidades de proteínas (KELLY e PRICE, 1997).

O CD baseia-se na diferença da absorção dos componentes polarizados da esquerda e direita da radiação plano-polarizada; a) intrínsecamente pelas reações de suas estruturas; b) pela existência de ligações covalentes para um centro quiral ou; c) pela existência localizada em um meio ambiente assimétrico (KELLY e PRICE, 1997).

As amostras das enzimas foram colocadas em uma cubeta de quartzo de 1cm de caminho óptico, contendo 1500µL de tampão fosfato de sódio 20mM pH 7,0. O volume de cada amostra de enzima variou de acordo com a sua concentração, que foram: 9,50µg de papaína; 15,20µg de fastuosaina; 18,60µg de bromelina do talo e 17,30µg de bromelina do fruto. A concentração foi obtida pelo método de Bradford, (BRADFORD, 1976).

Foi utilizado um espectropolarímetro J-710 (Jasco), usando comprimentos de onda entre 195nm e 260 nm, com uma sensibilidade de 50mdeg e repetições de 3 ciclos com resposta de 0,5seg. A velocidade foi 20nm/min, com uma abertura de fenda de 1,0nm.

3.23 Análise da Massa Molecular da Fastuosaina por Electrospray.

Este experimento foi realizado em colaboração com o Prof. Dr. Mario Sérgio Palma da UNESP de Rio Claro.

A amostra da Fastuosaina foi purificada e bloqueada com Ácido Iodoacético, e depois submetida a uma diálise contra água, para a remoção de sais, e depois liofilizada.

A Fastuosaina foi dissolvida em 50% (v/v) de acetonitrila (contendo 0,1% (v/v) de TFA), e analisada em Espectrômetro de Massa Micromass (Altrincham), modelo QUATTRO II, equipado com uma sonda padrão de eletrospray, ajustada para 5µl/min.

Durante todo o experimento a fonte de temperatura foi mantida em 80°C e a agulha com voltagem de 3,6kV, aplicando um fluxo de gás seco de nitrogênio de 200L/h e um nebulizador de gás com fluxo de 20L/h.

O espectrômetro de massa foi calibrado com mioglobina de coração de cavalo.

3.24 Extração do RNAm dos Frutos da *Bromelia fastuosa*.

Os experimentos de Biologia Molecular descritos a seguir foram realizados em colaboração com a Profa. Dra. Paula Rahal, Profa. Dra. Eloiza Tajara², e a Dra. Andréia Machado Leopoldino², do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas IBILCE-UNESP

A primeira vez que tentamos realizar a extração do RNAm, do fruto verde da *Bromelia fastuosa*, não obtivemos sucesso. Este insucesso, foi devido a um descuido, por não termos congelado os frutos assim que coletados, em N₂ líquido. Após uma nova coleta, os frutos foram armazenados em N₂ líquido, para a preservação do RNA.

Na extração do RNAm, seguimos o protocolo descrito por (CHOMEZYNSKI e SACCHI, 1987). Para tal, utilizamos 3mL de Trizol Reagente, (*Life Technologies*), o qual foi colocado em um almofariz, e depois cortamos pedaços dos frutos verdes congelados, e maceramos com a ajuda de um pistilo.

A seguir este macerado foi colocado em um tubo eppendorf, e adicionado 250µL de clorofórmio, e homogenizado por 1 minuto. Em seguida, foi deixado por 2 minutos na bancada. Depois foi centrifugado por 15 minutos a 4°C por 2000 xg.

Após esta centrifugação o sobrenadante foi retirado e colocado em um novo eppendorf, o qual já continha 500µL de Isopropanol gelado. Em seguida os tubos foram levemente invertidos, e foram deixados no freezer *overnight*, para a precipitação do RNAm.

No dia seguinte estes tubos foram centrifugados por 30 minutos a 4°C por 1400 xg. Os sobrenadantes foram descartados e adicionados 500µL de etanol 75%, para lavagem do precipitado.

² Atualmente na FAMERP (Faculdade de Medicina de S. J. Rio Preto).

Uma nova centrifugação foi realizada, agora por 10 minutos a 4°C a 15.000 xg. O sobrenadante foi descartado e o material precipitado foi seco em uma centrífuga a vácuo. Ao precipitado foi adicionado água DEPC, e colocado no termomix por 10 minutos a 56°C a 450rpm, para ressuspensão do precipitado.

Para verificação da qualidade do RNAm extraído, foi realizado um gel de agarose a 1% e corado com Brometo de Etídeo, para a visualização das bandas de RNA.

O RNAm foi então estocado em freezer -80°C, para evitarmos degradação e perda do material.

3.24.1 Amplificação do RNAm e Síntese do cDNA.

Para a amplificação do RNAm utilizamos iniciadores, que foram sintetizados baseados na seqüência do N-terminal da fastuosaina, obtido por degradação de Edman no projeto de Mestrado (CABRAL, 2001).

Comparando o N-terminal da fastuosaina com o da bromelina do talo, cuja homologia é de 88,88%, e a seqüência de nucleotídeos da bromelina do talo já depositada (nº D38534 do *Gene Bank*), desenhamos os *primers* baseados na seqüência de nucleotídeos da bromelina do talo.

A seqüência dos iniciadores foram:

Reverso: 5'-CCA CAA TGT CGA AGC AAG C-3'

Direto: 5'-GAA CCC AGT GAT CCC ATG ATG-3'

O procedimento para a realização da amplificação e síntese do cDNA, foi seguindo o protocolo do *Kit Super Script One-step RT-PCR with Platinum Taq*. (Invitrogen), onde foram feitas algumas modificações:

Componentes	Volume para 50 μ L	[Final]
Reação Mix 2x	25 μ L	1
<i>Primer</i> Direto	1 μ L	0,2 μ M
<i>Primer</i> Reverso	1 μ L	0,2 μ M
<i>RT/Platinum Taq Mix</i>	1 μ L	-----
RNA modelo	1 μ L	1 μ g
Água autoclavada	21 μ L	-----

Estas amostras foram colocadas na máquina de PCR, e foram realizados os seguintes ciclos para a síntese do cDNA:

* Pré-desnaturação e síntese do cDNA → 1 ciclo de 30 min. a 45°C, e 2 min. a 94°C;

* PCR de Amplificação → 39 ciclos, sendo: 15 segundos. a 94°C, para a desnaturação; 30 segundos. a 55°C para o anelamento, e 2 min./kb a 72°C para extensão;

* Extensão Final → 1 ciclo de 10 min. a 70°C.

3.24.2 Clonagem (Transformação).

O produto da amplificação por PCR (cDNA), foi clonado no plasmídio PCR 2.1-TOPO 3.9kb.

A reação de clonagem foi:

*Produto do PCR 4 μ L

*Solução de NaCl 1 μ L

*Vetor pCR 2.1-TOPO 3.9kb 1 μ L

Esta reação foi incubada a 22°C por 30 min.

Depois este produto (4 μ L) foi misturado com as bactéria *E. coli* TOP-10 (Invitrogen), sendo esta mantida no gelo por 30 min, seguidos por 1 min a 42°C (choque térmico), e em seguida foram adicionado 250 μ L do meio S.O.C..

Após incubação em gelo por 5 min. as bactérias foram deixadas num *shaker* a 37°C por 45 min. a 180rpm.

Após esta agitação as células foram semeadas no meio LB (com ampicilina 50µg/mL), com ágar, e incubadas em estufa a 37°C por 16 horas.

3.24.3 PCR das colônias.

Após as 16 horas de incubação, ocorreu o crescimento de colônias de bactérias, sendo que selecionamos as colônias brancas, que indicam a inserção do plasmídeo na bactéria. Quando isto ocorre a bactéria deixa de produzir a enzima, β -Galactosidase que degrada o substrato cromogênico 5-bromo-4-cloro-3-indolil- β -D-galactosídio (X-GAL) dando uma cor branca.

Destas colônias retiramos as bactérias para a realização do PCR, para confirmar a inserção do fragmento do gene da Fastuosaina. As bactérias foram colocadas em meio líquido 2xYT, para crescer em um *shaker* por 16 horas a 37°C por 180rpm.

3.24.4 Extração e Purificação do DNA Plasmidial.

Após o período de crescimento das bactérias, estas foram centrifugadas para a formação do *pellet* celular.

Depois estas células foram ressuspensas com 150mL de tampão de resuspensão, a 4°C do *Kit A Simple Nucleic Acid Prep* (Invitrogen), utilizando um vórtex, e em seguida foram adicionados mais 150µL de tampão de lise do *Kit A Simple Nucleic Acid Prep* (Invitrogen). Os tubos foram invertidos de 5 a 6 vezes e deixados por 3 min à temperatura ambiente.

Após este período, foram adicionados 150µL de sal de precipitação a 4°C do *Kit A Simple Nucleic Acid Prep* (Invitrogen), na mistura, e novamente invertidos de 6 a 8 vezes. Depois esta mistura foi centrifugada por 5 min a 2000 xg à temperatura ambiente.

Após a centrifugação descrita acima, o sobrenadante foi pipetado em um novo ependorfe, e descartamos o *pellet*. A este sobrenadante foram adicionados 600µL do tampão de ligação, do *Kit A Simple Nucleic Acid Prep* (Invitrogen), e invertidos 5 a 6 vezes para misturar; a seguir esta solução foi pipetada na coluna Miniprep do mesmo kit.

Esta coluna foi então centrifugada por 600 xg à temperatura ambiente por 30 seg. Foram adicionados 500µL de tampão de lavagem e novamente centrifugado por 9600g por 30 seg à temperatura ambiente, e o eluido foi descartado.

Em seguida, foi passado 900µL de tampão de lavagem 1X, do *kit* acima citado, e centrifugado por 9600 xg por 30 seg à temperatura ambiente, e novamente o eluído foi descartado. Novamente a coluna foi centrifugada nas mesmas condições para secá-la.

Foram adicionados 600µL do tampão TE, do *Kit A Simple Nucleic Acid Prep* (Invitrogen), e deixado por 3 min a temperatura ambiente. Depois foi centrifugado por 2000 xg por 30 seg para a eluição do plasmídio.

Após a eluição do cDNA plasmidial, este foi submetido a um PCR com o Big-Dye, para a amplificação da região desejada. Os componentes foram:

1,5µL Primer R do PUC 3,2µM	1,5µL Primer F do PUC 3,2µM
4,0µL <i>Big-Dye</i>	4,0µL <i>Big-dye</i>
2,0µL DNA plasmidial purificado	2,0µL DNA plasmidial purificado

Foram realizados 35 ciclos de:

96°C	2 seg.
96°C	10 seg.
50°C	5 seg.
60°C	4 seg.

3.24.5 Precipitação da reação de seqüenciamento no gel de seqüenciamento.

O produto obtido com o *big dye* foi precipitado do seguinte modo:

30µL de água ultra pura

5µL de acetato de potássio 3M pH 5,2

100µL Etanol absoluto

Depois esta mistura foi agitada e deixada por 15 min à temperatura ambiente, e em seguida foi centrifugada por 30 min a 100g a 4°C, desprezando o sobrenadante.

Em seguida foi adicionado 200µL de etanol gelado e centrifugado por 5 min a 100 xg a 4°C, e foi desprezado o sobrenadante; este procedimento foi repetido por mais uma vez.

Depois a amostra foi secada à temperatura ambiente, centrifugada por 3 min. 50 xg a 4°C, e depois colocada na estufa a 37°C por 2 horas para secagem.

A amostra do cDNA foi resuspendida no tampão *Loading buffer* composto pelos seguintes reagentes: Formamida/Blue Dextran EDTA, na proporção de 3:1, e aplicada no gel do sequenciador *377 Automated DNA sequencer* (ABI Prism).

3.25 Clonagem e Expressão da Fastuosaina.

Após a síntese do cDNA foi realizada a amplificação do fragmento de interesse utilizando os iniciadores listados na tabela 3 e a temperatura de anelamento de 55°C.

Tabela 3. Iniciadores utilizados para amplificação e clonagem de fastuosaina recombinante (Fast rec).

Nome do iniciador	Seqüência (5' - 3')
BRFNheI	TCAACGCTAGCGCAGTGCCTCAAAGTATTGATTGG
BRFBamHI	CCGCGGATCCTCACGATTGCAGAGTGGGAAAGAGGG

A análise do produto amplificado foi realizada por eletroforese em gel 1 % de agarose e por seqüenciamento direto utilizando o seqüenciador automático de DNA ABI377 (*Applied Biosystems*).

A reação de seqüenciamento foi feita utilizando-se: 2 µl do kit *Big Dye* (*Applied Biosystems*), 3,2 µM de iniciador BRFNheI, 180ng de DNA (do fragmento amplificado e purificado utilizando o kit *QIAquick Gel Extraction* (QIAGEN) e reação de seqüenciamento segundo o protocolo do fabricante (*Applied Biosystems*).

Após a análise do cDNA amplificado foi feita a digestão do fragmento *Fast-rec* primeiramente foi com a enzima de restrição *NheI* utilizando 1 U da enzima/ 1 µg de DNA, à temperatura de 37°C por 2 horas. Após a primeira clivagem o fragmento foi purificado, utilizando o kit *QIAquick Gel Extraction* (QIAGEN), segundo protocolo do fabricante.

A digestão do fragmento *Fast-rec* com a segunda enzima de restrição foi feita com a enzima *BamHI* utilizando 1U da enzima/ 1 µg de DNA, à temperatura de 37°C por 2 horas. O procedimento de purificação foi repetido conforme descrito acima.

Para a preparação do vetor de expressão pET23a foi realizada a digestão separadamente, com a enzima de restrição *NheI* e com a *BamHI*. Após cada digestão foi realizada a purificação do DNA conforme descrito acima.

Em seguida, o fragmento *Fast-rec* e o vetor digeridos e purificados foram submetidos à reação de ligação utilizando T₄ DNA ligase (Biolabs), segundo recomendações do fabricante.

O DNA recombinante (*Fast-rec* + pET23a) foi introduzido na bactéria *E. coli* linhagem BL21(DE3), utilizando o protocolo de transformação de células quimicamente competentes (SAMBROOK et al., 2002).

A seleção dos clones contendo o *DNA Fast-rec*, foi feita por PCR com os iniciadores específicos para o fragmento de interesse. Foram selecionados alguns clones para o seqüenciamento o qual foi feito utilizando-se; 2µl do *kit Big Dye* (*Applied Biosystems*), 3,2µM de iniciador *BRFNheI*, 180ng de DNA (do fragmento amplificado e purificado utilizando o *kit QIAquick Gel Extraction* (*QIAGEN*) e reação de seqüenciamento de acordo com o protocolo do fabricante (*Applied Biosystems*).

Após a confirmação do DNA recombinante, contendo o inserto com a seqüência correta, foram feitos os testes de expressão.

A indução da expressão só foi feita após atingirmos uma $OD_{600nm} = 0,60$.

A melhor condição para expressão da proteína recombinante *Fast-rec* foi obtida em meio LB com 1mM de IPTG, à 250rpm, à 28°C por 3 horas.

A cultura de bactérias após indução da expressão foi centrifugada a 10.000 xg por 5 min. O sobrenadante foi descartado, o precipitado de células foi ressuspenso em tampão de lise Hepes 30mM pH 7,5 com 150mM NaCl e 5mM de EDTA.

A lise celular foi realizada por congelamento em nitrogênio líquido e descongelamento, depois foi submetido a sonicação (6 pulsos de 70 %/15 s cada; Ultrasonic - Fisher, mantido em gelo), para o rompimento celular e liberação da Fastuosaina recombinante.

4. RESULTADOS.

4.1 Purificação da fastuosaina.

A purificação da fastuosaina foi bem sucedida, levando à forma pura, como podemos observar no perfil cromatográfico representado na figura 13. Podemos ver que o perfil de proteína (vermelho) se superpõe perfeitamente ao de atividade proteolítica (azul).

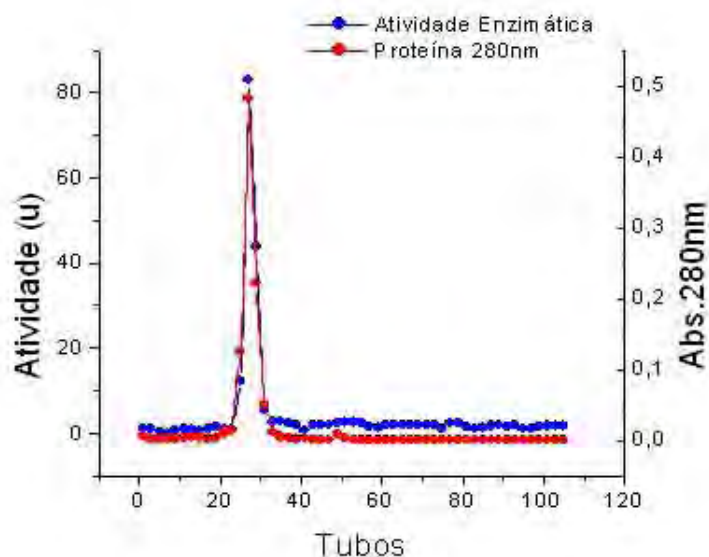


Figura 13. Perfil de eluição da Fastuosaina, após cromatografia de troca iônica (catiônica) em resina SP-Sepharose.

Este resultado é corroborado pelo gel SDS-PAGE da figura 14, onde temos apenas uma banda, que corresponde à Fastuosaina, na canaleta 1, e na outra canaleta (2) temos os marcadores de massa molecular. A massa molecular da fastuosaina foi estimado em 24KDa (CABRAL, 2001).



Figura 14. Gel SDS-PAGE a 13%, mostrando a Fastuosaina, purificada. Coloração com Nitrato de Prata.

A estimativa foi confirmada pela análise da massa molecular da Fastuosaina por espectrometria de massa (MS) Electrospray, (figura 15).

Observamos a presença de um pico de 19.315 Da e na sequência, um de 25.756 Da, que corresponde à enzima. Dessa massa, deve se retirar 275 Da do reagente bloqueador Ácido Iodoacético, restando dessa forma 25.481 Da.

Os demais picos são aparentemente produzidos pela agregação subsequente de moléculas da enzima, induzida pelo processo de liofilização. O primeiro pico possivelmente oriundo de autólise durante o processo de purificação, e esse fragmento da enzima, se associando com a Fastuosaina, (pico B), resultando no pico C com uma massa de 45.301 Da, e neste pico se associou mais uma molécula

da fastuosaina dando o pico D com uma massa de 70100Da, e assim suscetivamente.

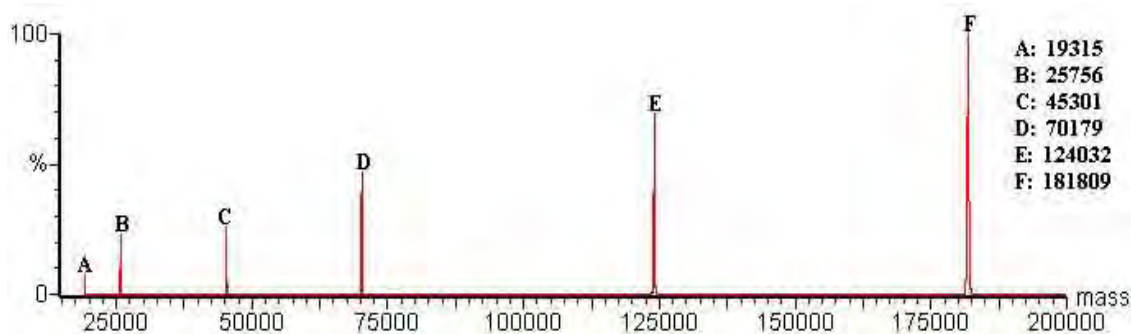


Figura 15. Gráfico deconvoluído da Fastuosaina (B), com sua respectiva massa molecular, obtido por espectrometria de massa.

Segundo SILVERTEIN et al. (1975), as cisteíno-peptidases podem sofrer autólise durante os processos de purificação, e foi o que observamos para a Fastuosaina, que sofre um processo de autólise e agregação destes “pedaços”, quando está em alta concentração, como tivemos a oportunidade de observar na figura 15.

4.2 Cinética Enzimática.

As figuras, 16, 17, 18 e 19, mostram os parâmetros cinéticos para a hidrólise do substrato de fluorescência apagada com substituições em S_1 , na série Abz-KLXFSKQ-EDDnp das enzimas fastuosaina, bromelina do talo e do fruto, e a papaína. A letra **X**, representa o resíduo de aminoácido substituído em cada substrato.

Os valores que se encontram sobre as barras nos gráficos a seguir refere-se aos valores de K_M , obtidos pela $Vel_{inicial} \times [Substrato]$, e os * significa que o valores de k_{cat}/K_M , foram obtido por cinética de pseudo primeira ordem.

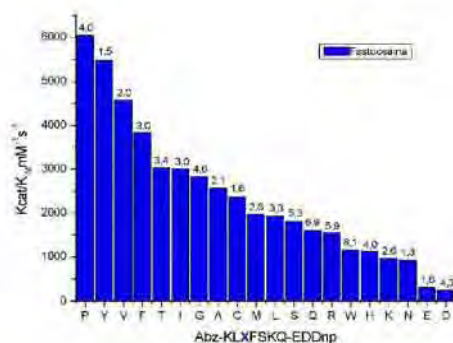


Figura 16. Eficiência catalítica (k_{cat}/K_M), da Fastuosaina, para hidrólise do substrato Abz-KLXFSKQ-EDDnp, do subsítio S_1 .

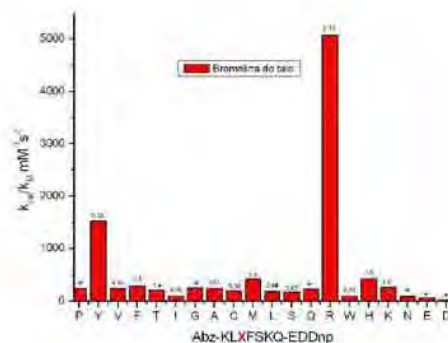


Figura 17. Eficiência catalítica (k_{cat}/K_M), da Bromelina do talo para hidrólise do substrato Abz-KLXFSKQ-EDDnp, do subsítio S_1 .

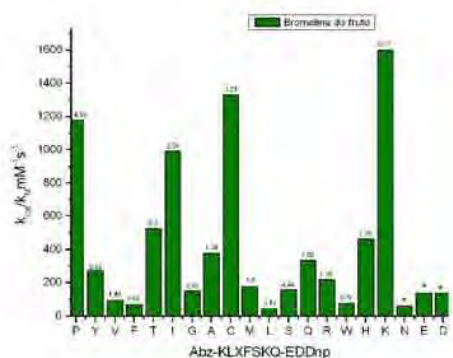


Figura 18. Eficiência catalítica (k_{cat}/K_M), da Bromelina do fruto, para hidrólise do substrato Abz-KLXFSKQ-EDDnp, do subsítio S_1 .

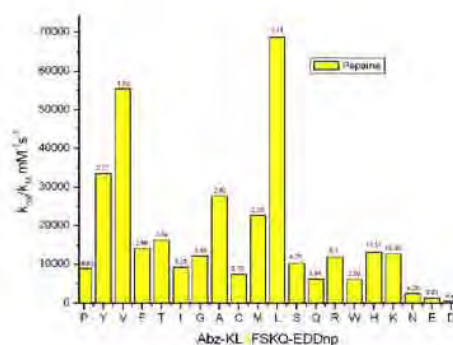


Figura 19. Eficiência catalítica (k_{cat}/K_M), da Papaína, para hidrólise do substrato Abz-KLXFSKQ-EDDnp, do subsítio S_1 .

A especificidade das enzimas fastuosaina, bromelina do talo e papaína, para a posição S_1 , foram; a fastuosaina tem preferência pelo resíduo Prolina, seguido por Tirosina e Valina, sugerindo um subsítio pouco seletivo, pois aceita resíduos de aminoácidos apolares (Pro e Val) e um resíduo polar (Tyr).

A fastuosaina, tem a menor preferência em S_1 , pelos resíduos dos aminoácidos; Ácido Aspártico, Ácido Glutâmico, (resíduos carregados negativamente) e Asparagina.

Já a bromelina do talo apresentou a maior preferência pelos resíduos de Arginina, Tirosina e Histidina no subsítio S_1 . Este subsítio também é pouco seletivo, pois aceita resíduos carregados positivamente (básicos), (Arg e His) e resíduos polares (Tyr).

Semelhante à fastuosaina, a bromelina do talo tem baixa afinidade pelos resíduos de aminoácidos; Ácido Aspártico, Ácido Glutâmico e Asparagina em S_1 .

As bromelinas do talo e do fruto, apresentam a maior preferência em S_1 por resíduos básicos Arg e Lys, respectivamente.

Em termos de eficiência catalítica, a papaína tem a maior, seguido pela fastuosaina e bromelina do talo, tendo a menor eficiência a bromelina do fruto.

Nas figuras, 20, 21, 22 e 23, temos os parâmetros cinéticos para a hidrólise do substrato de fluorescência apagada com substituições em S_2 , na série Abz-KXRFSKQ-EDDnp para as enzimas fastuosaina, bromelina do talo e do fruto e a papaína.

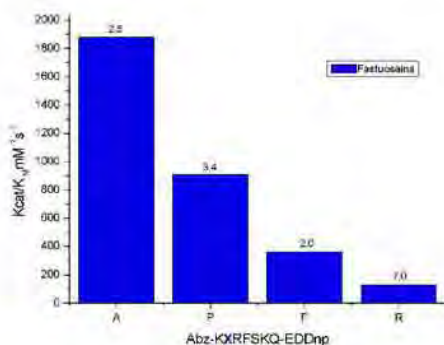


Figura 20. Eficiência catalítica (k_{cat}/K_M), da Fastuosaina, para hidrólise do substrato Abz-KXRFSKQ-EDDnp, do subsítio S_2 .

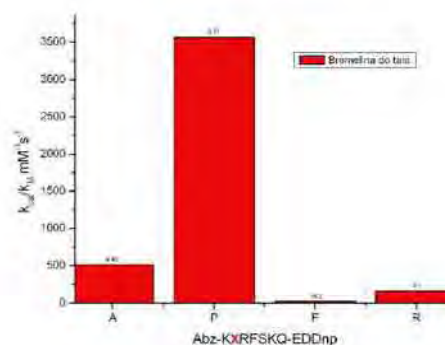


Figura 21. Eficiência catalítica (k_{cat}/K_M), da Bromelina do talo, para hidrólise do substrato Abz-KXRFSKQ-EDDnp, do subsítio S_2 .

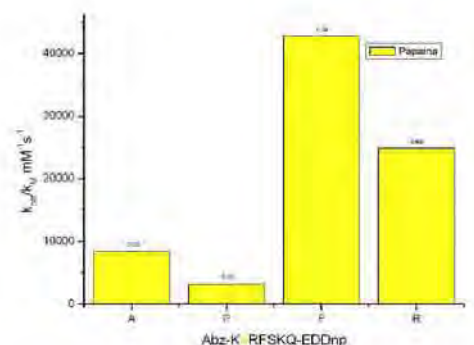
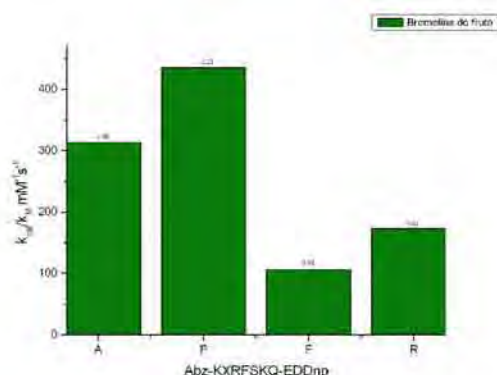


Figura 22. Eficiência catalítica (k_{cat}/K_M), da Bromelina do fruto, para hidrólise do substrato Abz-KXRFSKQ-EDDnp, do subsítio S_2 . **Figura 23.** Eficiência catalítica (k_{cat}/K_M), da Papaína, para hidrólise do substrato Abz-KXRFSKQ-EDDnp, do subsítio S_2 .

A especificidade em S_2 , para a fastuosaina foi por Alanina, seguido por Prolina, ambos resíduos apolares.

Somente a bromelina do fruto apresentou uma eficiência catalítica baixa para este subsítio, com maiores valores para a bromelina do talo e fastuosaina, mostrando assim que para este subsítio elas possuem pouca eficiência catalítica, mas uma seletividade maior, pois elas apresentaram preferências por aminoácidos apolares.

As figuras, 24, 25, 26 e 27, exibem os parâmetros cinéticos para a hidrólise do substrato de fluorescência apagada com substituições em S_3 , na série Abz-XLRFSKQ-EDDnp para as enzimas fastuosaina, bromelina do talo e do fruto e a papaína.

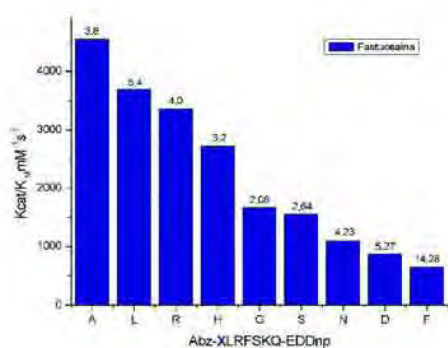


Figura 24. Eficiência catalítica (k_{cat}/K_M), da Fastuosaina, para hidrólise do substrato Abz-XLRFSKQ-EDDnp, do subsítio S_3 .

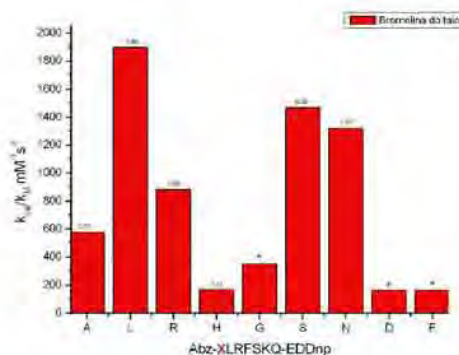


Figura 25. Eficiência catalítica (k_{cat}/K_M), da Bromelina do talo, para hidrólise do substrato Abz-XLRFSKQ-EDDnp, do subsítio S_3 .

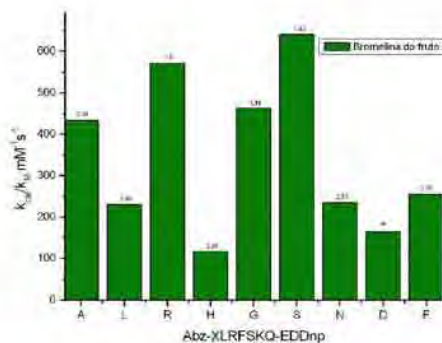


Figura 26. Eficiência catalítica (k_{cat}/K_M), da Bromelina do fruto, para hidrólise do substrato Abz-XLRFSKQ-EDDnp, do subsítio S_3 .

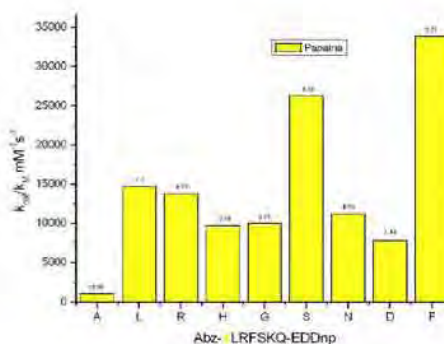


Figura 27. Eficiência catalítica (k_{cat}/K_M), da Papaína, para hidrólise do substrato Abz-XLRFSKQ-EDDnp, do subsítio S_3 .

Como podemos observar para o subsítio S_3 , embora três das enzimas prefiram resíduos hidrofóbicos, a segunda maior eficiência catalítica corresponde para a maioria, a um resíduo polar (Ser) ou um básico (Arg), ou seja não existe uma preferência clara nestes subsítio.

Uma diferença clara ocorre para a Phe, preferida pela papaína que ocupa a menor eficiência catalítica para a fastuosaina e bromelina do talo, tendo uma eficiência intermediária para a bromelina do fruto.

Já o Aspartato exibe baixa eficiência catalítica para as quatro enzimas.

Provavelmente os resíduos de aminoácidos dos quais fazem parte do subsítio S_3 das enzimas fastuosaina e bromelina do talo, devem apresentar características físico-químicas iguais.

Nas figuras, 28, 29, 30 e 31, temos os parâmetros cinéticos para a hidrólise do substrato de fluorescência apagada com substituições em S_1 , na série Abz-KLRXSKQ-EDDnp para as enzimas fastuosaina, bromelina do talo e do fruto e papaína.

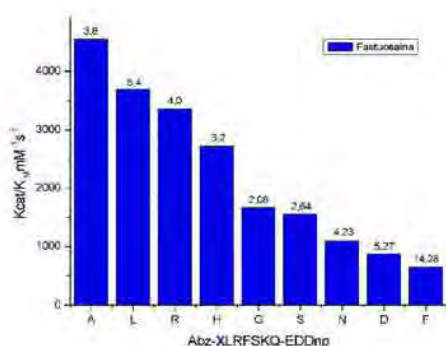


Figura 28. Eficiência catalítica (k_{cat}/K_M), da Fastuosaina, para hidrólise do substrato Abz-KLRXSKQ-EDDnp, do subsítio S_1 .

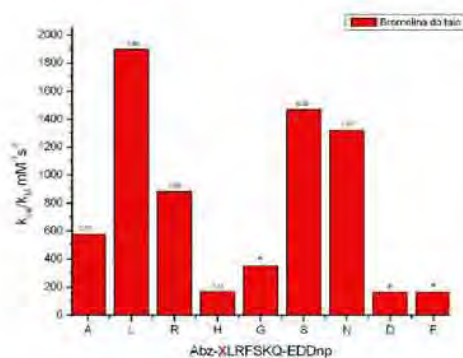


Figura 29. Eficiência catalítica (k_{cat}/K_M), da Bromelina do talo, para hidrólise do substrato Abz-KLRXSKQ-EDDnp, do subsítio S_1 .

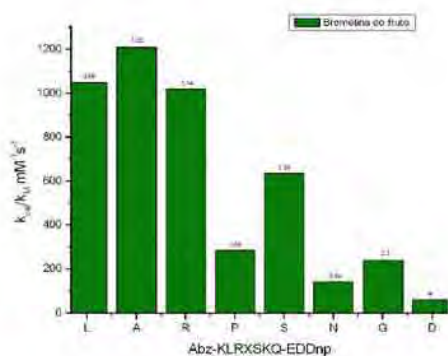


Figura 30. Eficiência catalítica (k_{cat}/K_M), da Bromelina do fruto, para hidrólise do substrato Abz-KLRXSKQ-EDDnp, do subsítio S_1 .

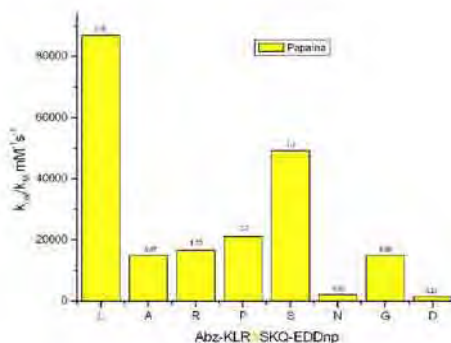


Figura 31. Eficiência catalítica (k_{cat}/K_M), da Papaína, para hidrólise do substrato Abz-KLRXSKQ-EDDnp, do subsítio S_1 .

No que se refere ao subsítio S'_1 , a maior eficiência catalítica é exibida para resíduos apolares: Leu ou Ala. A segunda maior eficiência também é para resíduos apolares para três das enzimas, com exceção da papaína.

A diferença de eficiência entre o resíduo que exibiu o maior valor e o segundo é clara para a fastuosaina e a papaína.

De forma consistente, as quatro enzimas exibiram menores eficiências para a Asn, Gln e Asp.

Para este subsítio a bromelina do fruto foi a enzima que apresentou a menor taxa de eficiência catalítica, seguido pela fastuosaina, bromelina do talo e papaína, respectivamente.

Nas figuras, 32, 33, 34 e 35, temos os parâmetros cinéticos para a hidrólise do substrato de fluorescência apagada com substituições em S'_2 , na série Abz-KLRFXXQ-EDDnp para as enzimas fastuosaina, bromelina do talo e do fruto e papaína.

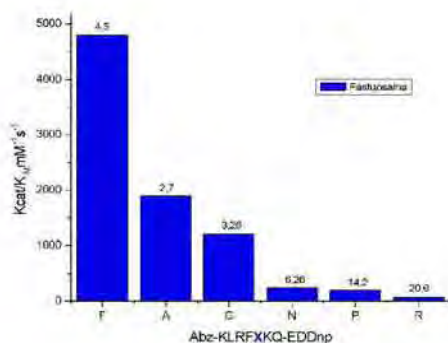


Figura 32. Eficiência catalítica (k_{cat}/K_M), da Fastuosaina, para hidrólise do substrato Abz-KLRFXXQ-EDDnp, do subsítio S'_2 .

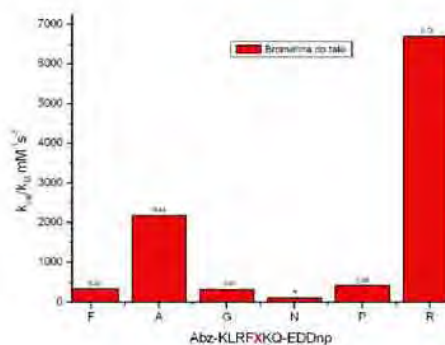


Figura 33. Eficiência catalítica (k_{cat}/K_M), da Bromelina do talo, para hidrólise do substrato Abz-KLRFXXQ-EDDnp, do subsítio S'_2 .

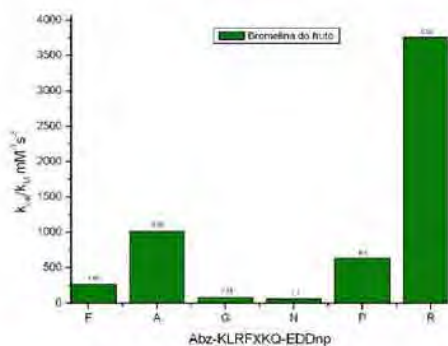


Figura 34. Eficiência catalítica (k_{cat}/K_M), da Bromelina do fruto, para a hidrólise do substrato Abz-KLRFXXQ-EDDnp, do subsítio S_2 .

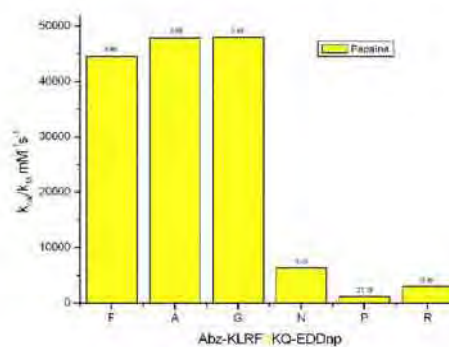


Figura 35. Eficiência catalítica (k_{cat}/K_M), da Papaína, para a hidrólise do substrato Abz-KLRFXXQ-EDDnp, do subsítio S_2 .

Em relação ao subsítio S_2 , existem diferenças substanciais, pois a maior eficiência é exibida pela fastuosaina e a papaína, para resíduos apolares, enquanto as duas bromelinas preferem a Arginina, um resíduo básico.

A segunda e terceira maior eficiência é para resíduos apolares para as quatro enzimas, sendo a Ala constante na segunda posição.

Chama, contudo, a atenção, a diferença de eficiência catalítica entre o primeiro e o segundo valores, o que não acontece somente com a papaína.

Novamente a papaína foi a enzima com a maior atividade catalítica das três, seguida pela bromelina do talo, fastuosaina e por fim a bromelina do fruto.

Nas figuras, 36, 37, 38 e 39, temos os parâmetros cinéticos da hidrólise do substrato de fluorescência apagada com substituições em S'_3 , na série Abz-KLRFXXQ-EDDnp para as enzimas fastuosaina, bromelina do talo e do fruto e papaína.

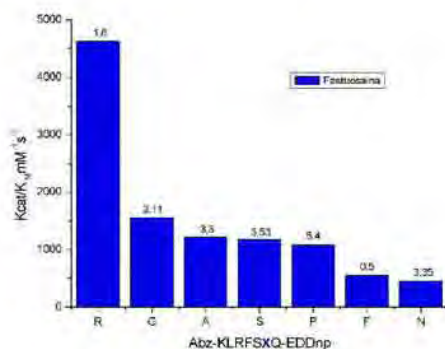


Figura 36. Eficiência catalítica (k_{cat}/K_M), da Fastuosaina, para a hidrólise do substrato Abz-KLRFSXQ-EDDnp, do subsítio S₃.

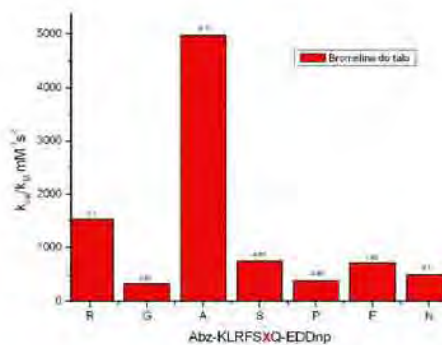


Figura 37. Eficiência catalítica (k_{cat}/K_M), da Bromelina do talo, para a hidrólise do substrato Abz-KLRFSXQ-EDDnp, do subsítio S₃.

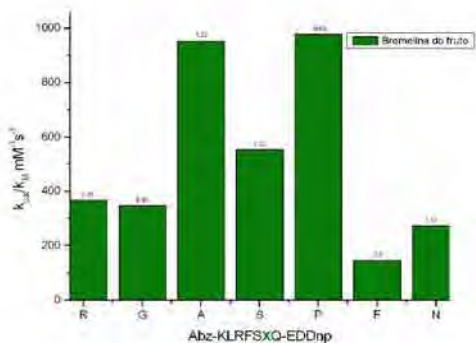


Figura 38. Eficiência catalítica (k_{cat}/K_M), da Bromelina do fruto, para a hidrólise do substrato Abz-KLRFSXQ-EDDnp, do subsítio S₃.

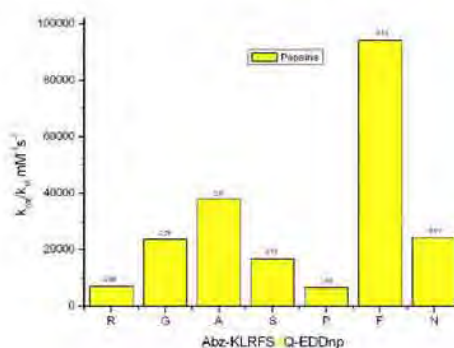


Figura 39. Eficiência catalítica (k_{cat}/K_M), da Papaína, para o substrato Abz-KLRFSXQ-EDDnp, do subsítio S₃.

No que se refere ao subsítio S₃, com exceção da fastuosaina, as demais preferem resíduos apolares. A diferença de eficiência catalítica entre o resíduo preferencial e o segundo colocado é clara na maioria dos casos, com exceção da bromelina do talo.

A especificidade para a fastuosaina em S₃, mostrado na figura 36, foi para o resíduo de Arginina, seguido por Glicina, sendo este subsítio não muito específico, pois aceita resíduos ácidos (carregados positivamente) e resíduos apolares, e tem baixa afinidade por Ácido Aspártico e Fenilalanina.

A bromelina do talo aceita Arginina e Alanina, e esta enzima também mostrou que o subsítio S'_3 não é muito específico, pois aceita resíduos ácido e apolar, igual a fastuosaina, e tem baixa afinidade por Glicina e Prolina, e a bromelina do fruto aceita Pro.

Em resumo, vemos na tabela 4, que temos os valores das eficiências catalíticas, obtidos pelos 3 maiores valores deste parâmetro para as enzimas fastuosaina, papaína, bromelina do talo e bromelina do fruto.

Tabela 4. Resumo dos dados de eficiência catalítica das enzimas fastuosaina, papaína, bromelina do talo e bromelina do fruto. Em amarelo são representados os resíduos apolares, em brancos polares e em azul os básicos.

Enzimas	S_3	S_2	S_1	S'_1	S'_2	S'_3
Fastuosaina	A	A	P	L	F	R
	L	P	Y	A	A	G
	R	F	V	R	G	A
Papaína	F	F	L	L	G	F
	S	R	V	S	A	A
	L	A	Y	P	F	N
Bromelina do Talo	L	P	R	A	R	A
	S	A	Y	P	A	R
	N	R	H	L	P	S
Bromelina do Fruto	S	P	K	A	R	P
	R	A	C	L	A	A
	G	R	P	R	P	S

A análise da tabela 4, mostra a ausência de interações favoráveis, com resíduos ácidos, com predomínio de apolares seguidos por básicos e em menor proporção por polares.

Considerando a maior eficiência catalítica apenas a papaína prefere para todos os subsítios resíduos apolares. A fastuosaina exibiu o comportamento mais semelhante, pois a única diferença surgiu no subsítio S'_3 .

Por outro lado, as bromelinas do talo e do fruto foram bastante similares, entre si, tendo diferenças apenas no subsítio S_3 .

Os subsítios S_1 e S_2 das bromelinas são claramente diferentes à papaína e a fastuosaina.

Através dos experimentos de especificidade tivemos a oportunidade de observar as semelhanças e as diferenças em alguns subsítios das enzimas aqui em estudo. A fastuosaina, a bromelina do talo e do fruto e a papaína mostraram ser específica para os subsítios S_2 e S_2' .

A papaína foi sempre a enzima com a maior atividade catalítica, seguido pela fastuosaina, pela bromelina do talo e por fim a bromelina do fruto, sendo que para esta enzima a melhor série de substratos foi para o S_1' , onde ela apresentou uma atividade catalítica maior que a fastuosaina e menor que a papaína.

A bromelina do fruto sempre apresentou a menor eficiência catalítica.

4.3 Determinação do pH ótimo das enzimas fastuosaina, bromelina do talo e do fruto e papaína.

A figura 40, mostra o perfil da atividade catalítica das enzimas fastuosaina, bromelina do talo e do fruto e da papaína, em função do pH, utilizando o substrato Abz-KLRFSKQ-EDDnp. Vemos que o pH ótimo para esse substrato, é de 7,5 para as três primeiras enzimas, e menor (pH 6,5), para a papaína.

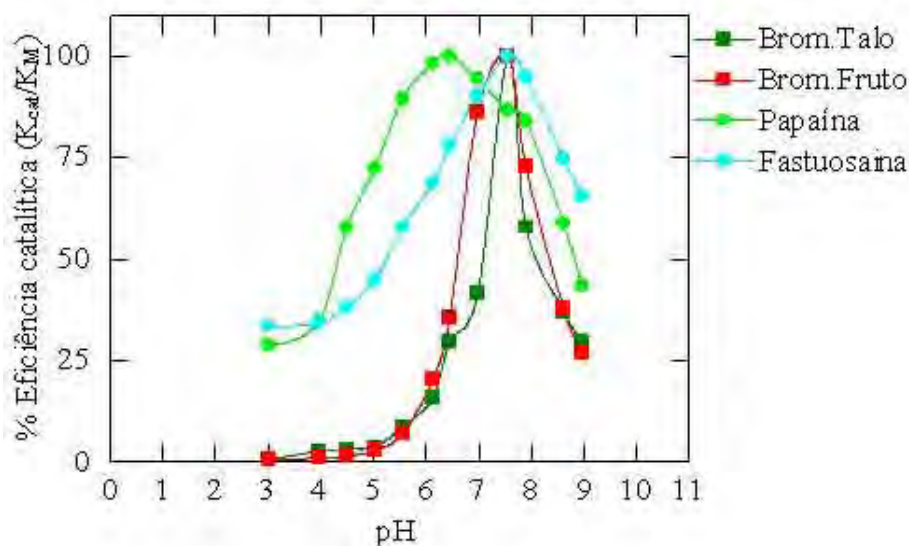


Figura 40. Eficiência catalítica das enzimas Fastuosaina, Bromelina do talo e do fruto e da Papaína, em função do pH, utilizando o substrato Abz-KLRFSKQ-EDDnp.

Os pHs ótimos das enzimas fastuosaina, bromelina do talo e do fruto, em relação ao pH ótimo da papaína, têm uma diferença de uma unidade de pH, sugerindo diferenças de ionização dos resíduos do sítio catalítico.

4.4 Efeito da presença de uréia na atividade catalítica das enzimas fastuosaina, bromelina do talo e do fruto e da papaína, utilizando o substrato Abz-KLRFSKQ-EDDnp.

A figura 41, representa a atividade catalítica das enzimas fastuosaina, bromelina do talo e do fruto e da papaína, na presença do agente desnaturante uréia, utilizando o substrato Abz-KLRFSKQ-EDDnp.

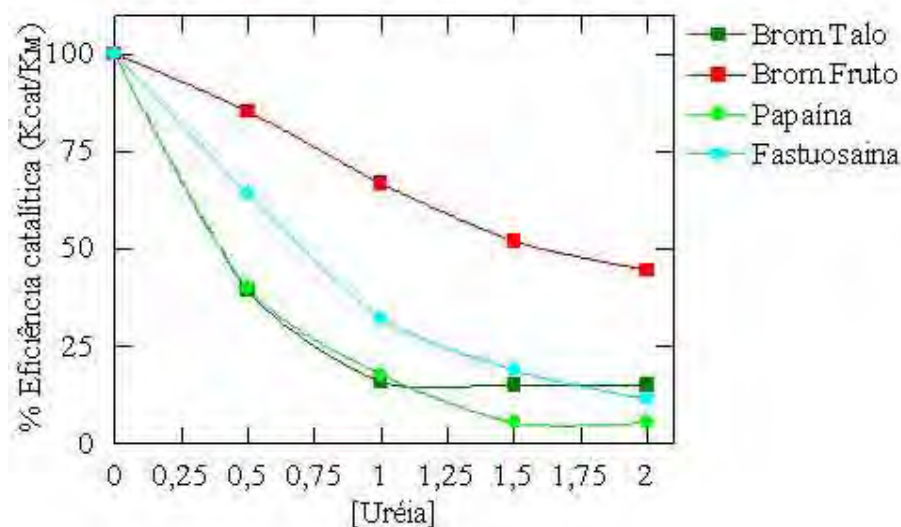


Figura 41. Efeito da concentração de uréia sobre a eficiência catalítica das enzimas Fastuosaina, Bromelina do talo e do fruto, e da Papaína, utilizando o substrato Abz-KLRFSKQ-EDDnp.

Observamos que com o aumento da concentração de uréia, ocorre um decréscimo da atividade catalítica das quatro enzimas. A fastuosaina mostrou ser mais resistente a desnaturação do que a papaína na presença da uréia. Como podemos ver na figura 41, a fastuosaina mostrou uma atividade remanescente de praticamente 65% com 0,5M de uréia, enquanto a papaína apenas 40%, e esta resistência maior persistiu na faixa de concentrações testadas.

A atividade catalítica na presença de uréia mostrou que a bromelina do fruto é mais resistente do que a fastuosaina e a bromelina do talo e a papaína; quando atingimos a concentração de 0,5M de uréia a bromelina do fruto perdeu

apenas 15% de sua atividade catalítica, enquanto a fastuosaina perdeu por volta de 35% da sua atividade catalítica, já a bromelina do talo e a papaína perderam praticamente 60% de sua atividade catalítica com 0,5M de uréia.

4.5 Efeito da presença de Cloreto de Sódio na atividade catalítica das enzimas fastuosaina, bromelina do talo e do fruto e da papaína, utilizando o substrato Abz-KLRFSKQ-EDDn.

A figura 42, representa a atividade catalítica das enzimas fastuosaina, bromelina do talo e do fruto e da papaína, em função do aumento da concentração de cloreto de sódio, utilizando o substrato Abz-KLRFSKQ-EDDnp.

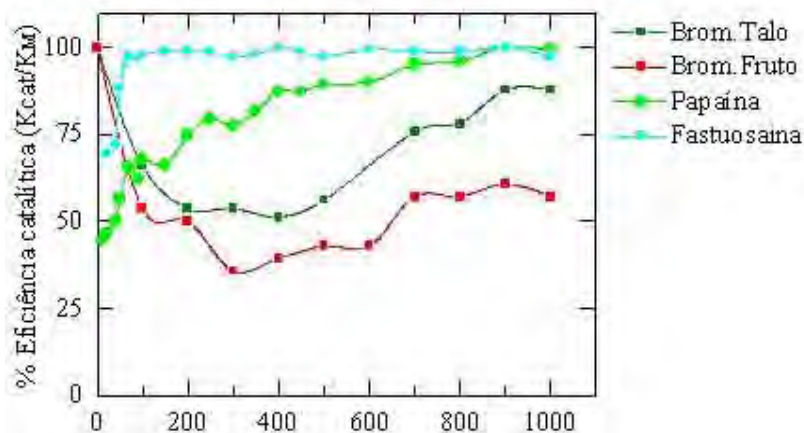


Figura 42. Efeito da concentração do cloreto de sódio, sobre a eficiência catalítica das enzimas Fastuosaina, Bromelina do talo e do fruto e da Papaína, utilizando o substrato Abz-KLRFSKQ-EDDnp.

O NaCl mostrou ser um ativador sobre a atividade catalítica da fastuosaina e da papaína, já para a atividade catalítica das bromelinas do talo e do fruto, o NaCl teve um efeito inibidor, embora as maiores concentrações mostrem uma elevação.

Para a fastuosaina, com aproximadamente 150mM de NaCl, atingiu a sua atividade catalítica máxima, e mantém esta atividade constante até a concentração de 1,0M.

Para a papaína, conforme aumentou a concentração do NaCl, a atividade catalítica aumentou, sem atingir um platô, chegando a sua atividade máxima com 900mM de NaCl.

Já para as bromelinas do talo e do fruto, a atividade catalítica diminuiu conforme aumentamos a concentração de NaCl; para a bromelina do talo, a atividade chegou ao seu nível mais baixo com 200mM de NaCl, onde praticamente manteve a sua atividade. Quando aumentamos acima dos 400mM, a atividade catalítica subiu, chegando ao seu máximo com 900mM de NaCl. Mesmo assim, para esta enzima houve uma perda de 15% da sua atividade catalítica.

Com a bromelina do fruto a atividade catalítica diminuiu até 300mM de NaCl, subindo acima desta concentração. Com 900mM ela atinge a sua atividade catalítica máxima, e mesmo assim houve uma perda da sua atividade catalítica, de aproximadamente 55%.

4.6 Estabilidade térmica da fastuosaina, bromelina do talo do fruto e da papaína.

As figuras 43, 44, 45 e 46 mostram a estabilidade térmica sobre a atividade catalítica das enzimas fastuosaina, bromelina do talo do fruto e da papaína, utilizando caseína a 1%, como substrato para tal experimento.

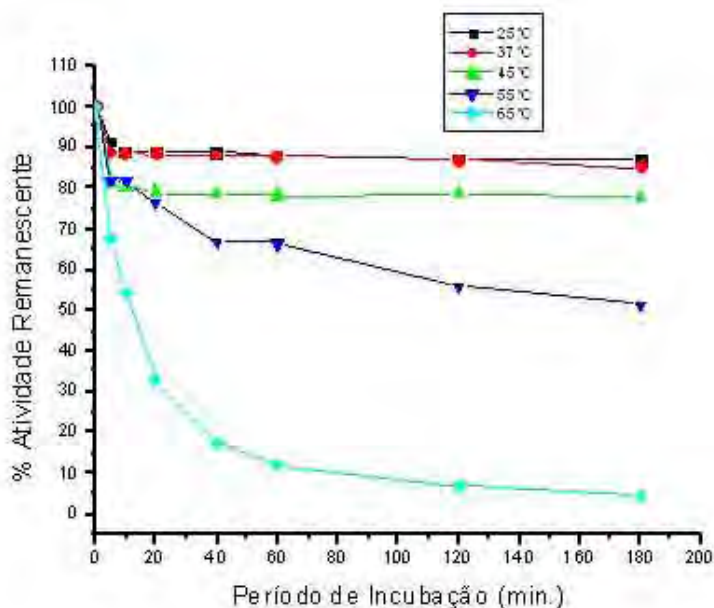


Figura 43. Estabilidade térmica da Fastuosaina, utilizando como substrato caseína a 1%, preparada em tampão Fosfato de sódio pH 7,0.

A figura 43, mostra o efeito da estabilidade térmica da fastuosaina. Como podemos observar a fastuosaina perdeu 10% de sua atividade catalítica nas temperaturas de 25 e 37°C, durante 3 horas de incubação. A 45°C, a fastuosaina perdeu 20% de sua atividade catalítica durante 3 horas de incubação. Já com 55°C a perda de atividade após de 3 horas de incubação chegou a 45%, e a 65°C, ela perde a sua atividade rapidamente sendo que com 40 minutos de incubação perdeu 85% de sua atividade catalítica.

Quando analisamos o efeito da estabilidade térmica sobre a atividade catalítica da bromelina do talo, (figura 44), podemos observar que a 25°C ela perdeu 5 % de sua atividade catalítica no final de 3 horas de incubação, já a 37°C, ela perdeu por volta de 30% de sua atividade catalítica. A 45°C, a perda de atividade após de 3 horas foi de 55%, e a 55°C e 65°C após 1 hora de incubação a bromelina do talo praticamente já não apresentava atividade catalítica.

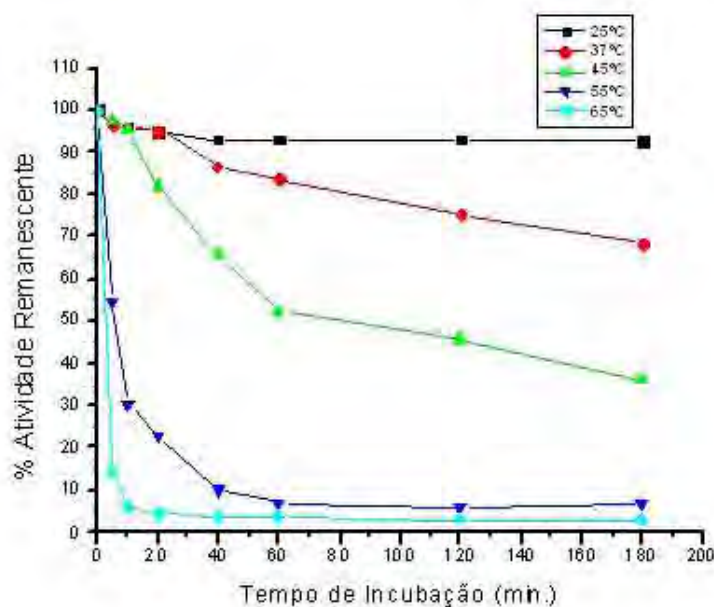


Figura 44. Estabilidade térmica da Bromelina do talo, utilizando como substrato caseína a 1%, preparada em tampão Fosfato de sódio pH 7,0.

A bromelina do fruto (figura 45), perdeu 10% de sua atividade catalítica depois de incubada por 3 horas a 25°C, e a 37° ela perdeu 20%. Quando atingimos a temperatura de 45°C, a atividade remanescente foi de 65% após 3 horas de incubação, e a 55°C, perdeu 75% de sua atividade catalítica. Após 3 horas de incubação a 65°C, ela não apresentou mais atividade catalítica.

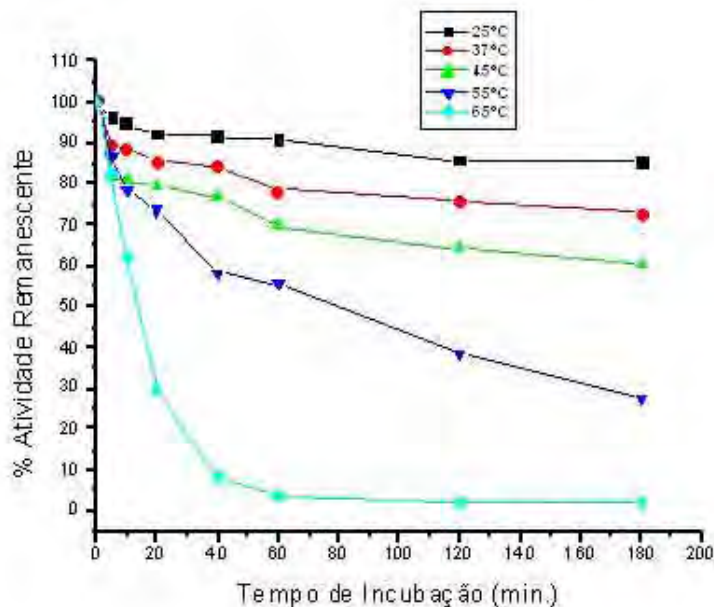


Figura 45. Estabilidade térmica da Bromelina do fruto, utilizando como substrato caseína a 1%, preparada em tampão Fosfato de sódio pH 7,0.

A papaína (figura 46), mostrou ser mais sensível a estabilidade térmica quando comparado com a fastuosaina, como podemos observar na figura 46. Nas temperaturas de 25 e 37°C, a papaína perdeu 10 e 30%, respectivamente da atividade catalítica depois de 3 horas. Com a temperatura de 45°C ela chegou a perder 55% de sua atividade catalítica após 3 horas de incubação, o mesmo aconteceu a 65°C, onde ela perdeu por volta de 60% de sua atividade. A 65°C a papaína conseguiu manter a atividade catalítica por mais tempo do que a fastuosaina, pois com 3 horas de incubação ela ainda tinha 20% de sua atividade catalítica.

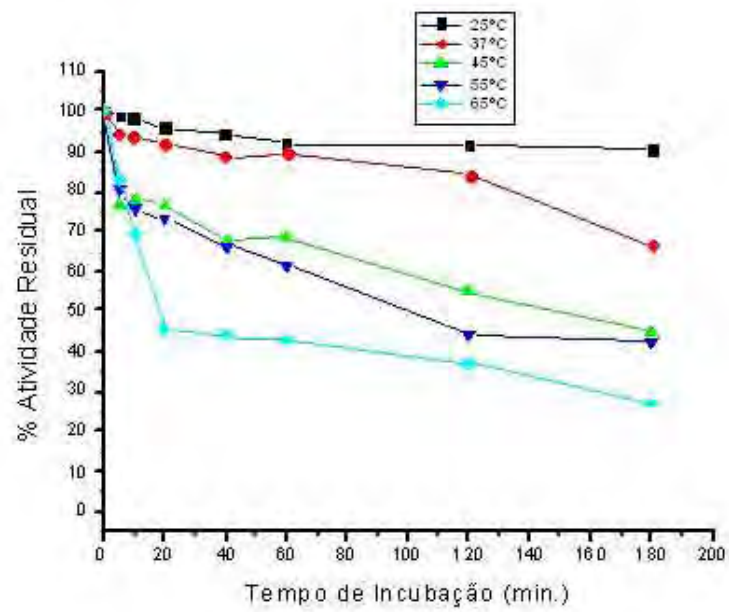


Figura 46. Estabilidade térmica da Papaína, utilizando como substrato caseína a 1%, preparada em tampão Fosfato de sódio pH 7,0.

4.7 Extração do RNA total, dos Frutos da *Bromelia fastuosa*.

A figura 47, mostra o gel de agarose a 1%, no qual podemos observar a presença de duas bandas, que correspondem ao RNA 28 e 18s.

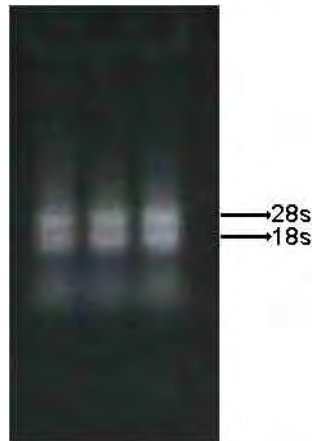


Figura 47. Gel de agarose a 1% do RNA total, extraído de frutos verdes da *Bromelia fastuosa*.

A figura 48, mostra o gel de agarose a 1%, indicando a região amplificada da Fastuosaina com 1096 pb, do cDNA, extraído dos frutos verdes da *Bromelia fastuosa*, utilizando os *primers* abaixo mostrados.

A sequência dos *primers*, baseado no N-terminal da enzima, foi:

Reverso: 5'-CCA CAA TGT CGA AGC AAG C-3'

Direto: 5'-GAA CCC AGT GAT CCC ATG ATG-3'

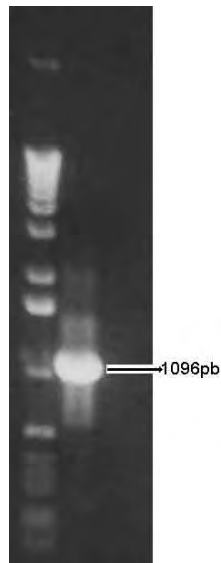


Figura 48. Gel de agarose a 1%, mostrando a banda amplificada com 1096pb, que corresponde à região codificadora da enzima Fastuosaina.

A figura 49, mostra a sequência do gene codificador da enzima fastuosaina, com suas pró-regiões.

Através desta informação, chegamos à sequência primária dos resíduos de aminoácidos que compõem a fastuosaina, através da tradução da sequência dos nucleotídeos.

A figura 50, mostra a tradução da sequência de nucleotídeos, para os resíduos de aminoácidos da Fastuosaina, obtida através do site da UFMG, www.icb.ufmg.br/~infobio/.

A figura 51, mostra o alinhamento dos aminoácidos das enzimas fastuosaina, ananaína, bromelina do talo e a papaína.

```

GAACCCAGTGATCCCATGATGGAGAGGTTTGAAGAATGGATGGCTGAGTAC
GGCCGAGTTTACAATGACAACGCCGAGAAGATGCGCCGGTTTCAAATATTC
AAGAACAACGTGAACCATATTGAAACCTTTAACAATCGCAGCGGAAATTCG
TACACTCTTGGTGTCAATCAATTTACCGATATGACAAACAATGAATTTCTT
GCTCGATATACTGGTGCATCTCTCCCACTAAATATTGAGAGAGATCCAGTG
GTGTCGTTTGGACGACGTAGACATCTCCGCAGTGCCTCAAAGTATTGATTGG
AGAGACTATGGTGCCGTAACAAGTGTCAAAAATCAAGGCAGCTGCGGTTCT
TGCTGGGCATTTCAGTGCAATTGCGACGGTGGAAGGAATCTACAAGATCAAA
GCAGGTAACCTTAATATCTCTATCAGAGCAGGAAGTTCTCGATTGTGCTCTT
AGCTACGGGTGCGATGGCGGCTGGGTGAACAAGGCCTATGATTTTCATCATA
TCTAACAATGGTGTGACGTCCTTTGCTAACTTACCATACAAAGGATACAAA
GGCCCTTGCAACCACAATGACTTGCCCAATAAAGCTTACATTACTGGTTAT
ACATATGTGCAAAGCAATAACGAACGCAGCATGATGATCGCGGTGGCGAAT
CAACCAATAGCTGCTCTTATCGATGCCGGCGGAGACTTTCAATATTACAAA
AGCGGTGTGTTTACTGGATCTTGTGGAAGTAGCCTCAATCATGCCATCACC
GTTATAGGTTACGGGCAGACTAGTAGCGGAACAAAATATTGGATAGTAAAG
AACTCATGGGGTACCTCATGGGGTGAGCGTGGATACATCCGTATGGCCAGA
GATGTGTCATCACCATATGGATTGTGTGGAATCGCCATGGCTCCCCCTCTTT
CCCACTCTGCAATCGGGGGCCAATGCCGAAGTTATTAAGATGATTTCTGAA
AGTTGAAGCTCCGTATAAGTCGGAAGCGATGATCTAGCAATGCACTGCAGT
TTGCTAGCTATCTAAGCTGCTTAGTTATAAATAAGGATGTATGCATCTAGT
TGTTCTGCTTGCTTCGACATTGTGG

```

Figura 49. Sequência total do gene codificador da enzima Fastuosaina, a partir do cDNA.

```

EPSPMMERFEEWMAEYGRVYNDNAEKMRRFQIFKNNVNHIEFTN
NRSGNSYTLGVNQFTDMTNNEFLARYTGASLPLNIERDPVVSFDD
VDISAVPQSIDWRDYGAVTSVKNQSGSCSWAFSAIATVEGIYKI
KAGNLI SLSEQEVLDCALSYGCDGGWVNKAYDFIISNNGVTSFAN
LPYKGYKGPCNHNDLPNKAYITGYTYVQSNNERSMMIAVANQPIA
ALIDAGGDFQYYKSGVFTGSCGTSLNHAITVIGYGQTSSTGKYWI
VKNSWGT SWGERGYIRMARDVSSPYGLCGIAMAPLEPTLQSGANA
EVIKMISES

```

Figura 50. Sequência de resíduos de aminoácidos da enzima Fastuosaina, em preto as pró-regiões, e em vermelho a enzima madura.

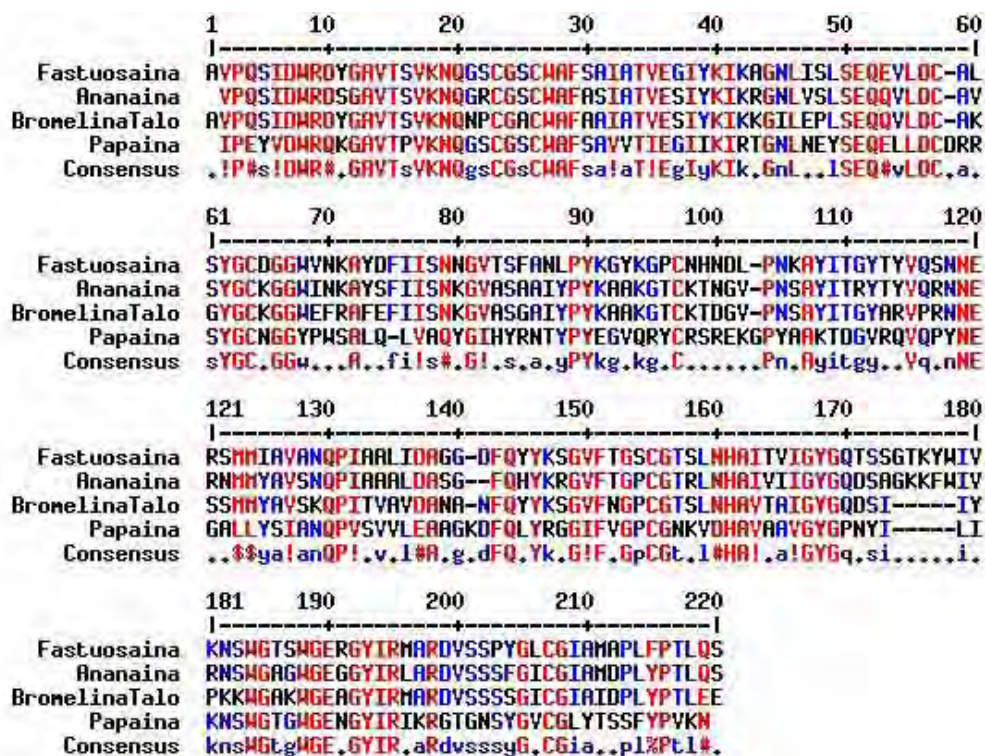


Figura 51. Alinhamento das enzimas Fastuosaina, Ananaina, Bromelina do Talo e Papaina, através do programa computacional Multalin, (CORPET, 1988).

Como podemos observar na figura 50, a fastuosaina é composta por pró-regiões, com 94 resíduos de aminoácidos do lado N-terminal e 13 resíduos de aminoácidos do lado C-terminal.

Pela figura 51, podemos observar que existem várias regiões idênticas nas seqüências primárias, como já era esperado, pois todas as peptidases aqui estudadas pertencem à mesma família de enzimas, onde a enzima “ modelo” é a Papaina.

A região idêntica se concentra mais na região do N-terminal, pois é esta a região que compõe principalmente a região do sítio catalítico.

4.8 Caracterização preliminar da fastuosaina recombinante (Fast-rec).

Na figura 52, temos um gel SDS-PAGE 13% corado com nitrato de prata, mostrando a banda da fastuosaina clonada, (canaleta 2) e também a banda da Fastuosaina extraída do fruto da *Bromelia fastuosa*, (canaleta 1).



Figura 52. Gel SDS-PAGE, a 13%, corado com nitrato de prata mostrando a banda da Fastuosaina nativa (1) e a banda da Fastuosaina clonada (2).

Na figura 53, temos a curva de pH da Fastuosaina clonada (Fast-rec), a qual possui um pH ótimo por volta de 7,3, utilizando caseína como substrato.

Este valor de pH ótimo, é semelhante ao obtido para a fastuosaina nativa, que foi de 7,5, utilizando o substrato sintético Abz-KLRFSKQ-EDDnp.

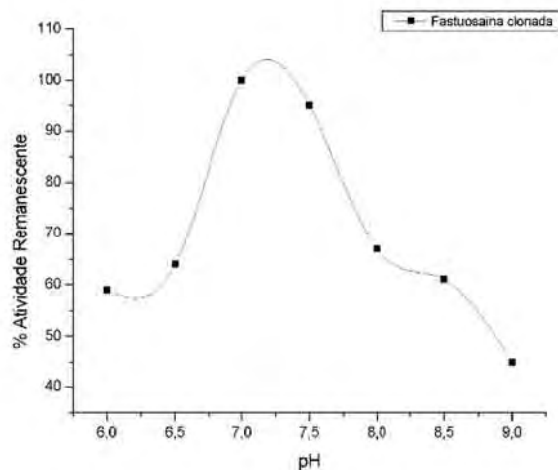


Figura 53. Curva de pH ótimo para a enzima Fastuosaina clonada, utilizando como substrato a caseína a 1%.

A figura 54, mostra o efeito de desnaturação em função do aumento da concentração de uréia. Como podemos observar, a Fast-rec vai perdendo sua atividade catalítica em função do aumento da concentração de uréia, com a concentração de 0,5M de uréia a Fast-rec perdeu 40% de sua atividade catalítica.

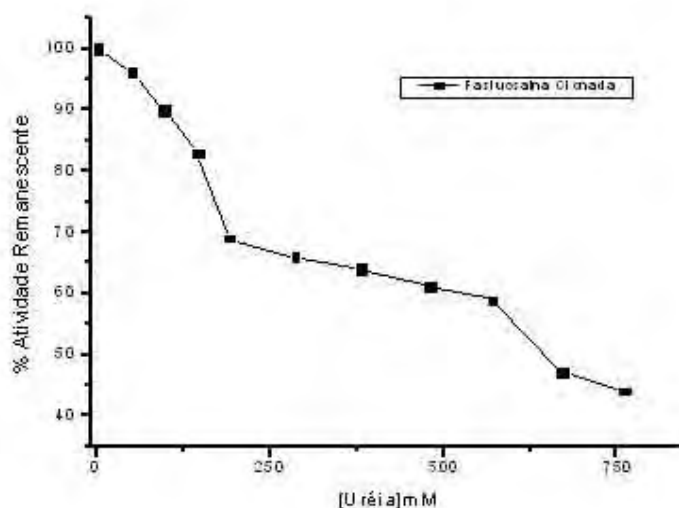


Figura 54. Efeito da concentração de uréia sobre a atividade catalítica da Fast-rec, utilizando como substrato caseína a 1%.

Pela figura 55, foi possível determinar a temperatura ótima da Fast-rec. É possível observar que esta enzima possui uma temperatura ótima por volta de 55°C.

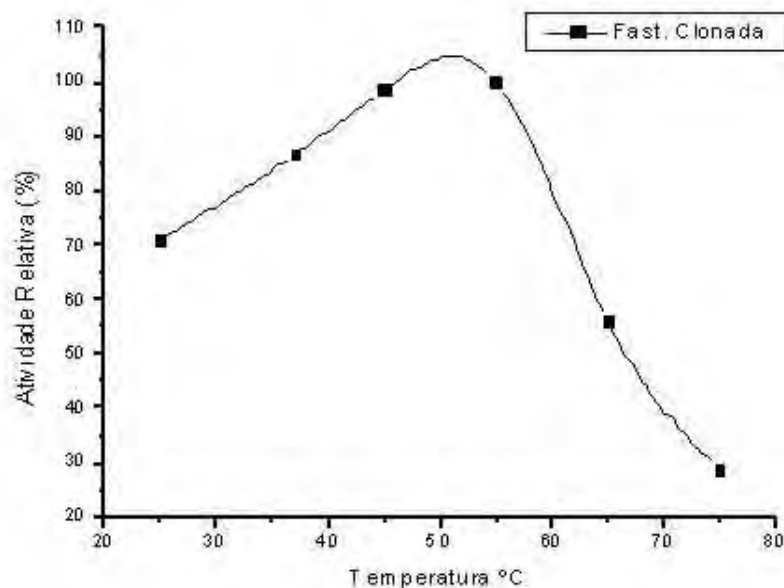


Figura 55. Efeito da temperatura sobre a atividade catalítica da Fast-rec, utilizando como substrato caseína a 1%, em incubação de 20 minutos.

A enzima clonada possui a mesma temperatura ótima em relação a enzima extraída do fruto da *Bromelia fastuosas*, (Cabral et al., 2005).

A figura 56, mostra o efeito da estabilidade térmica sobre a atividade catalítica da enzima Fast-rec.

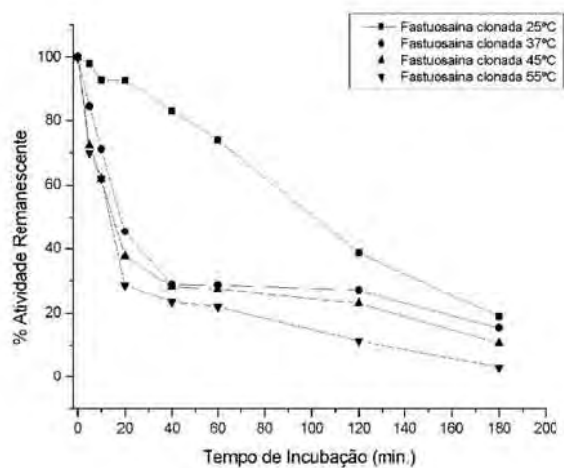


Figura 56. Efeito da estabilidade térmica sobre a atividade catalítica da enzima Fast-rec, utilizando como substrato a caseína a 1%.

Como podemos observar a Fast-rec, apresentou ser mais sensível à temperatura do que a Fastuosaina nativa.

4.9 Determinação da estrutura secundária, utilizando Dicroísmo Circular.

A figura 57, mostra os espectros obtidos por Dicroísmo Circular das enzimas fastuosaina, bromelina do talo e do fruto e da papaína, no seu estado nativo.

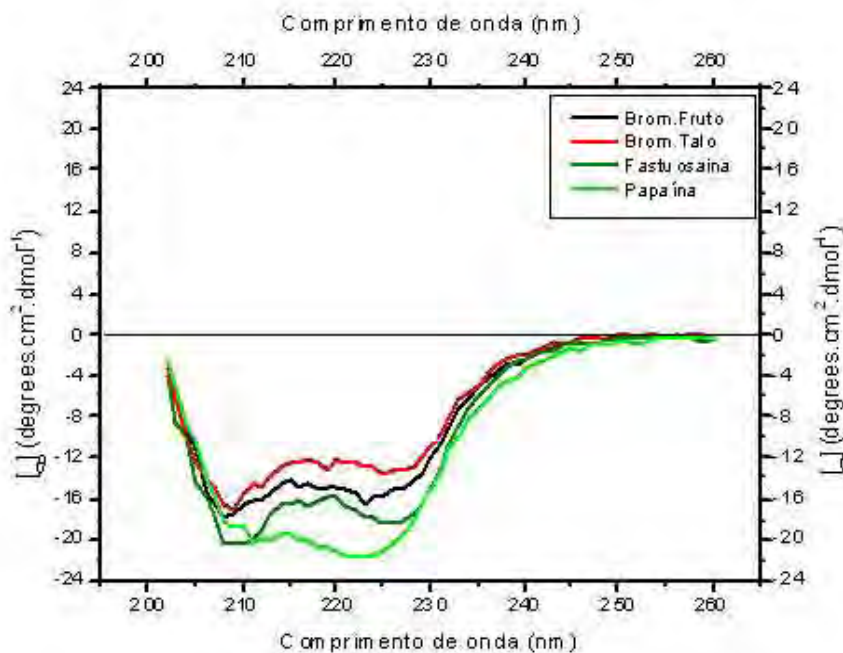


Figura 57. Perfil dos espectros obtidos por dicroísmo circular das estruturas secundárias das enzimas Fastuosaina, Bromelina do talo, e do fruto e da Papaína, em tampão fosfato de sódio pH 7,0.

Os espectros obtidos para as estruturas secundárias das enzimas fastuosaina, bromelina do talo e do fruto, (figura 57), mostraram uma certa semelhança, já o da papaína teve um aspecto um pouco diferente.

Esta classe de proteína se destaca por possuir α -hélice separadas e regiões ricas em folhas- β . Exibe 2 bandas negativas próximo dos comprimentos de onda de 208nm e 222nm, e uma banda positiva na região de 190-195nm.

4.10 Análise de glicoproteínas e determinação da composição de carboidratos das enzimas fastuosaina, bromelinase papaína.

Após a purificação, realizamos o ensaio enzimático nos tubos coletados para localizar as enzimas e depois realizamos o método do fenol-sulfúrico, para garantirmos que não havia carboidrato contaminando as amostras; (ver os cromatogramas no anexo I).

A seguir as amostras das enzimas foram submetidas a uma eletroforese SDS-PAGE, corada com comassie para proteínas (figura 58), e um outro gel foi corado com o Reagente de Schiff, (figura 59), cuja coloração é específica para carboidrato.

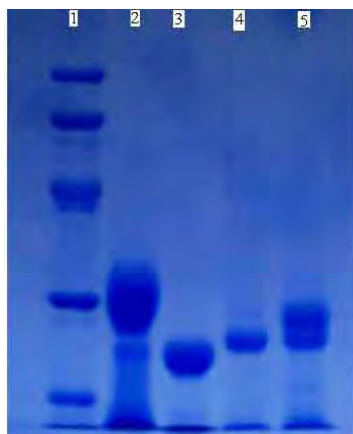


Figura 58. Eletroforese SDS-PAGE a 13%, corada com Comassie R-250. Canaleta 1 padrão peso molecular, canaleta 2 Papaína, canaleta 3 Fastuosaina, canaleta 4 Bromelina do Talo e canelate 5 Bromelina do Fruto.



Figura 59. Eletroforese SDS-PAGE a 13%, corada com reagente de Schiff. Canaleta 1 padrão peso molecular, canaleta 2 Papaína, canaleta 3 Fastuosaina, canaleta 4 Bromelina do Talo e canaleta 5 Bromelina do Fruto.

Pelos cromatogramas, nos quais vimos que as amostras não estavam contaminadas com carboidrato, e pelo gel da figura 59, as enzimas estudadas aqui, tratam-se de glicoproteínas.

Através dos resultados obtidos do gel SDS-PAGE, corado com a coloração de Schiff (PAS), coloração específica para carboidratos, segundo CARLSSON (1993), podemos dizer que a fastuosaina, bromelinas do talo e do fruto e a papaína, são todas glicoproteínas.

A tabela 5 mostra a composição e a quantificação de cada monossacarídeo presente na porção do carboidrato da fastuosaina.

Tabela 5. Determinação e quantificação da composição da porção de carboidratos presentes na enzima Fastuosaina.

	Fucose (ng)	Galactosamina (ng)	Glicosamina (ng)	Galactose (ng)	Glicose (ng)	Manose (ng)
Fastuos.2M TFA 2 h	6,0	220	58	108	79	144
Fastuos.2M TFA 4 h	6,0	175	83	101	94	148
Fastuos.2M TFA 6 h	31	342	185	246	213	180
Fastuos.2M TFA 8 h	6,0	175	56	54	41	75
Fastuos.4M TFA 1h	8,0	188	67	130	93	172
Fastuos.4M TFA 3 h	30	470	207	340	307	730
Fastuos.4M TFA 5 h	-----	-----	-----	-----	-----	-----
Fastuos.4M TFA 7h	8,0	335	131	256	197	325

Para a fastuosaina as melhores condições de análise foram: 2M de TFA 6 horas de incubação a 100°C e 4 M de TFA 3 horas de incubação. Por alguma razão que desconhecemos o material de 5 horas de incubação com 4 M de TFA acabou

desaparecendo, e assim não sendo possível quantificar a quantidade dos monossacarídeos liberados nesta condição.

Além da determinação da melhor condição de hidrólise dos oligossacarídeos, que foi um experimento secundário, o principal foi a determinação da composição do oligossacarídeo de todas as enzimas aqui estudadas.

A composição de oligossacarídeos da fastuosaina, foi dado pelos seguintes monossacarídeos: Fucose, Galactose, Glicosamina, Galactose, Glucose e Manose.

Já na tabela 6, temos a composição e a quantificação dos constituintes da porção de carboidrato para a enzima bromelina do talo.

Tabela 6. Determinação e quantificação da composição da porção de carboidratos presentes na enzima Bromelina do Talo.

	Fucose (ng)	Galactosamina (ng)	Glucosamina (ng)	Galactose (ng)	Glucose (ng)	Manose (ng)
Brom. Talo 2M TFA 2h	34	2965	652	1606	125	210
Brom. Talo 2M TFA 4h	27	2379	567	1372	138	216
Brom. Talo 2M TFA 6h	95	102	83	92	15	232
Brom. Talo 2M TFA 8h	33	2671	705	1653	188	256
Brom. Talo 4M TFA 1h	58	4520	1040	2965	295	460
Brom. Talo 4M TFA 3h	26	2600	590	1565	165	218
Brom. Talo 4M TFA 5h	4	81	59	86	12	92
Brom. Talo 4M TFA 7h	28	2200	655	1657	175	270

Para a bromelina do talo as melhores condições foram: 2M de TFA 8 horas de incubação a 100°C e 4M de TFA 1 hora de incubação. No caso desta enzima a condição de 4M e 5 horas de incubação a 100°C, o material não seguiu a desaparecer

por completo, mas a quantidade liberada foi muito pequena quando comparada com 1 hora de incubação e 4M de TFA, cujo tempo de incubação é menor e liberou mais monossacarídeos, e com 7 horas de incubação e com 4M de TFA, temos uma quantidade maior de monossacarídeo do que com 5 horas, indicando que não houve a degradação total do material.

Na tabela 7, temos a composição e a quantificação de cada monossacarídeo constituinte da porção do carboidrato da bromelina do fruto.

Tabela 7. Determinação e quantificação da composição da porção de carboidratos presentes na Bromelina do Fruto.

	Fucose (ng)	Galactosamina (ng)	Glucosamina (ng)	Galactose (ng)	Glucose (ng)	Manose (ng)
Brom. Fruto 2M TFA 2h	132	575	427	297	290	528
Brom. Fruto 2M TFA 4h	132	580	518	300	294	530
Brom. Fruto 2M TFA 6h	20	100	262	32	48	184
Brom. Fruto 2M TFA 8h	100	570	560	308	307	473
Brom. Fruto 4M TFA 1h	107	385	140	250	240	477
Brom. Fruto 4M TFA 3h	57	365	314	210	188	342
Brom. Fruto 4M TFA 5h	113	485	493	283	300	537
Brom. Fruto 4M TFA 7h	77	338	409	244	246	360

As melhores condições para a bromelina do fruto foram: 4 horas com 2M de TFA e 5 horas com 4M de TFA todas a 100°C. Diferente da fastuosaina e da bromelina do talo, não houve a perda do material com 5 horas de incubação com 4 M de TFA.

O monossacarídeo com maior quantidade detectado por este método para a Fastuosaina foi a Galactosamina, seguido pela Manose. Para a bromelina do talo foram a Galactosamina e Galactose, respectivamente. Já para a bromelina do fruto foram Manose, seguido pela Galactosamina, e para a papaína foram a Galactose e Glicose, respectivamente.

Já na tabela 8, temos a composição e a quantificação dos monossacarídeos presentes na papaína.

Tabela 8. Determinação e quantificação da composição da porção de carboidratos presentes na Papaína

	Fucose (ng)	Galactosamina (ng)	Glucosamina (ng)	Galactose (ng)	Glucose (ng)	Manose (ng)
Papaína 2M TFA 2h	-----	-----	-----	1088	375	-----
Papaína 2M TFA 4h	-----	-----	-----	970	370	-----
Papaína 2M TFA 6h	-----	-----	-----	1340	500	-----
Papaína 2M TFA 8h	-----	-----	-----	1200	455	-----
Papaína 4M TFA 1h	19	-----	222	611	-----	-----
Papaína 4M TFA 3h	10	2,0	-----	1320	-----	-----
Papaína 4M TFA 5h	8,0	3,0	-----	1000	-----	-----
Papaína 4M TFA 7h	-----	-----	-----	1400	-----	-----

Para a papaína não temos uma condição que podemos afirmar que foi a melhor, pois esta enzima apresentou poucos monossacarídeos. Na literatura a papaína é considerada como uma proteína não glicosilada, mas nós podemos observar pelo gel SDS-PAGE corado com PAS, que a papaína foi corada, e pela análise em HPAEC, detectamos a presença de alguns monossacarídeos.

Mesmo assim, fica difícil afirmar que a papaína é uma glicoproteína, pois ela quase não apresentou Galactosamina e Glicosamina, que são os dois tipos de monossacarídeos que podem fazer a ligação do oligossacarídeo com a parte proteica através dos resíduos de aminoácidos Ser, Thr e Asn, para termos então uma glicoproteína.

4.11 Modelagem da enzima fastuosaina.

De posse da sequência da enzima Fastuosaina, realizamos o alinhamento da sequência desta enzima com o modelo da Papaína (código PDB ID: 9 PAP), (figura 60), obtendo assim uma identidade de 44,70%. Segundo a literatura, acima de 30% de identidade, os modelos são mais confiáveis, e também por que estas enzimas pertencem à mesma família.

	1	10	20	30	40	50	60
Fastuosaina	-----						
Papaína	-----						
Consensus	-----						
Fastuosaina	AVPQSIDMROYGAVTSYKNQSGSGCHAFSAIATVEGIYKIKAGNLISLSEQEVLOC-AL						
Papaína	IPEYVDNRQKGAVTPYKNQSGSGCHAFSAVVTIEGIIKIRTGNLNQYSEQLLDCRR						
Consensus	.!P#s!DNR#kGAVTpYKNQSGSGCHAFSA!a!IEGIiKIrAGNLnq!SEQELLDC,ar						
	61	70	80	90	100	110	120
Fastuosaina	-----						
Papaína	-----						
Consensus	-----						
Fastuosaina	SYGCDGGHVNKAYDFIISNNGVTSFANLPYKGYKGPCNHNDL-PNKAYITGYTYVQSNNE						
Papaína	SYGCNGGYPHSAIQ-LVAQYGIHYRNTYPYEGVQRYCRSREKGPYAAKTGVRQVQPYNQ						
Consensus	SYGC#GGwpnkAl#.i!a#nG!hsranlPYeGyqrpCrhr#l.PnaRkidGyrqVQpn#						
	121	130	140	150	160	170	180
Fastuosaina	-----						
Papaína	-----						
Consensus	-----						
Fastuosaina	RSMHIAVANQPIAALIDAGG-DFQYYKSGVFTGSCGTSLNHAITVIGYGQTSSGTYWIV						
Papaína	GALLYSIANQPVSVVLQAAGKDFQLYRGGIFVGPCGNKVDHAVAAYGYGPN-----YILT						
Consensus	ra\$\$ia!ANQP!aali#AaG.DFQlYrgG!FtGpCGnkl#HA!aa!GYGqn....Yii!						
	181	190	200	210	220		
Fastuosaina	-----						
Papaína	-----						
Consensus	-----						
Fastuosaina	KNSWGTSMGERGYIRHARDVSSPYGLCGIAMAPLFPTLQS						
Papaína	KNSWGTGMGENGYIRIKRGTGNSYGVCLYTSSFPYVKN						
Consensus	KNSWGTgMGErGYIRiaRdtgnpYGLCGianapl%PtI#.						

Figura 60. Alinhamento dos resíduos de aminoácidos da Fastuosaina com o seu molde Papaína (PDB ID: 9PAP). Os resíduos de aminoácidos em vermelho na linha de *consensus*, indica os resíduos idênticos e os resíduos de aminoácidos em azul homólogos.

Apesar desta identidade de 44,70%, não podemos afirmar que o modelo gerado seja a estrutura correta, já que esta estrutura não foi obtida experimentalmente por difração de raios X, MNR e EPR.

A figura 61, mostra a estrutura terciária da Fastuosaina, de diversas perspectivas, destacando os resíduos da tríade catalítica, após a modelagem molecular.

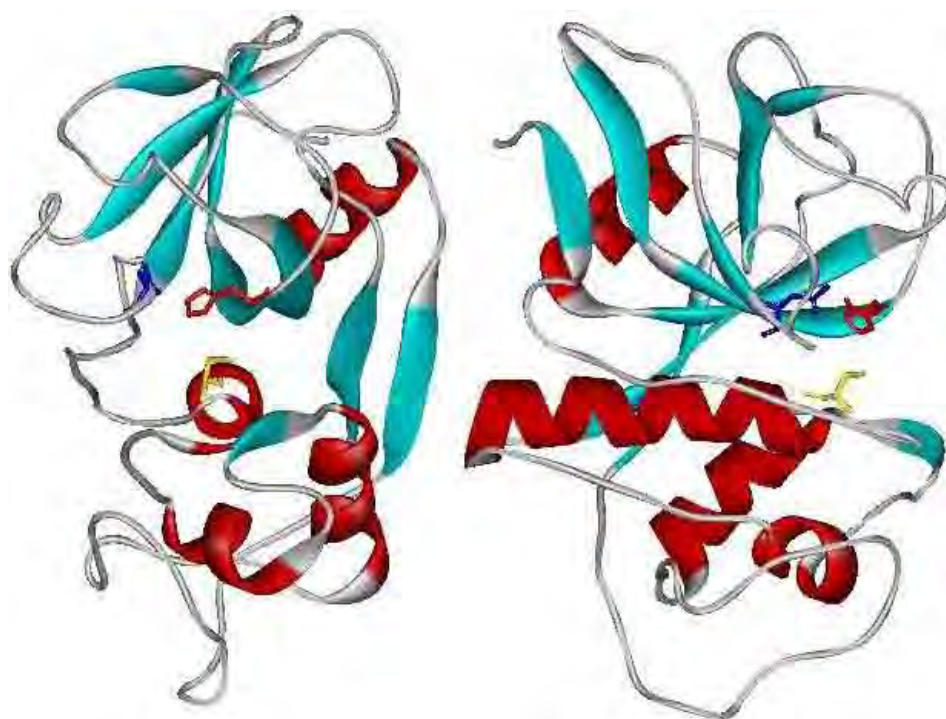


Figura 61a) frente; b) lado 1. Estrutura terciária da fastuosaina, obtida por modelagem molecular, utilizando como molde a papaína (9 PAP). Os resíduos em destaque são referente a tríade catalítica, composta pelos resíduos Cys-26 (amarelo), His-159 (vermelho) e Asn-175 (azul). A figura foi gerada pelo programa computacional ViewerLite.

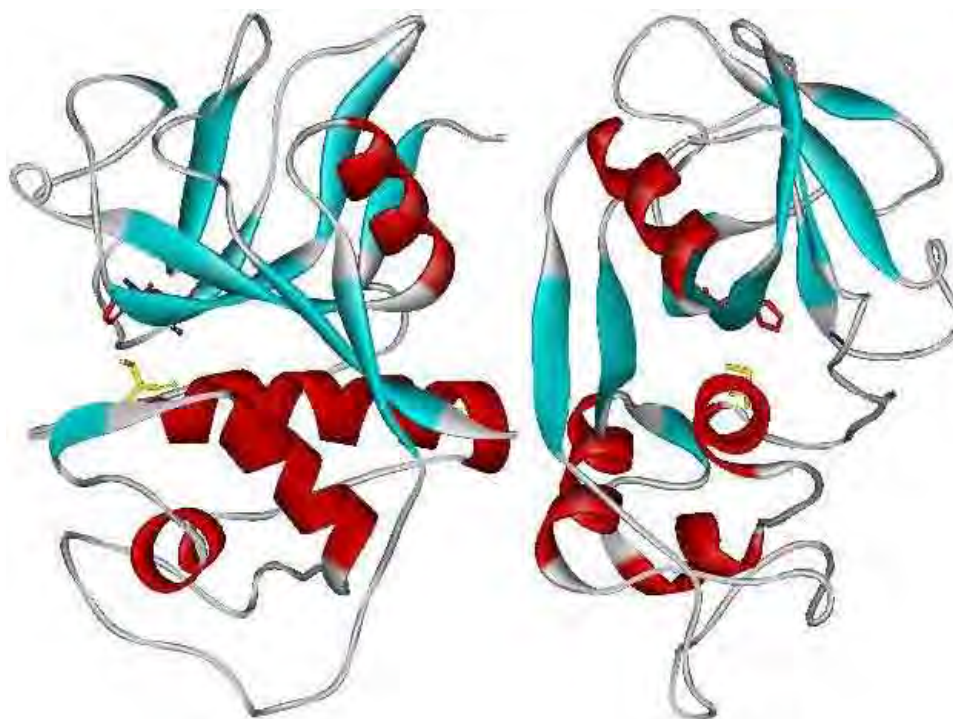


Figura 61c) lado 2; d) fundo. Estrutura terciária da fastuosaina, obtida por modelagem molecular, utilizando como molde a papaína (9 PAP). Os resíduos em destaque são referente a triade catalítica, composta pelos resíduos Cys-26 (amarelo), His-159 (vermelho) e Asn-175 (azul). A figura foi gerada pelo programa computacional ViewerLite.

A fastuosaina é constituída por 217 resíduos de aminoácidos, em uma única cadeia, a qual possui um enovelamento (*folding*), formando 2 domínios (figura 61), que são separados por uma fenda, sendo nesta, encontrado o sítio ativo.

Chamamos estes domínios de DI e DII, sendo que o DII é composto pelos resíduos de aminoácidos 1 a 11 e 112 a 212 e o DI pelos resíduos 18 ao 111, e os resíduos 12 a 17 e 213 a 217 fazem a ligação destes dois domínios.

Na figura 62, temos o gráfico de Ramachandran para estrutura terciária da enzima fastuosaina, feito com o programa PROCHECK.

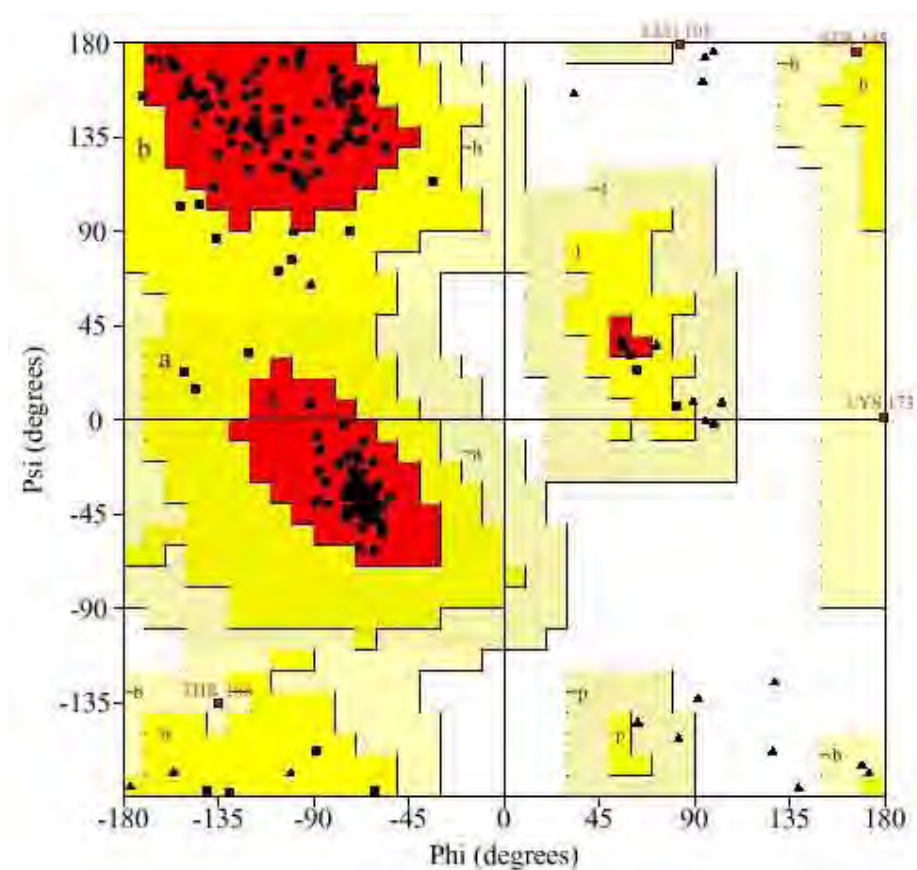


Figura 62. Gráfico de Ramachandran, gerado a partir das coordenadas tridimensionais da fastuosaina, obtido através do programa PROCHECK.

O gráfico de Ramachandran da fastuosaina mostra que 87,9% dos resíduos encontram na região muito favorável, 9,9% na região adicionalmente favorável, 1,6% na região generosamente favorável e 0,5% na região não permitida, este resíduo é a Leu-101 que se encontra na superfície da estrutura da fastuosaina em uma área de *randon-coil*, no domínio da α -hélice.

A figura 63, mostra o alinhamento dos resíduos de aminoácidos das pró-enzimas pró-fastuosaina e pró-caricaína (código PDB ID: 1PCI).

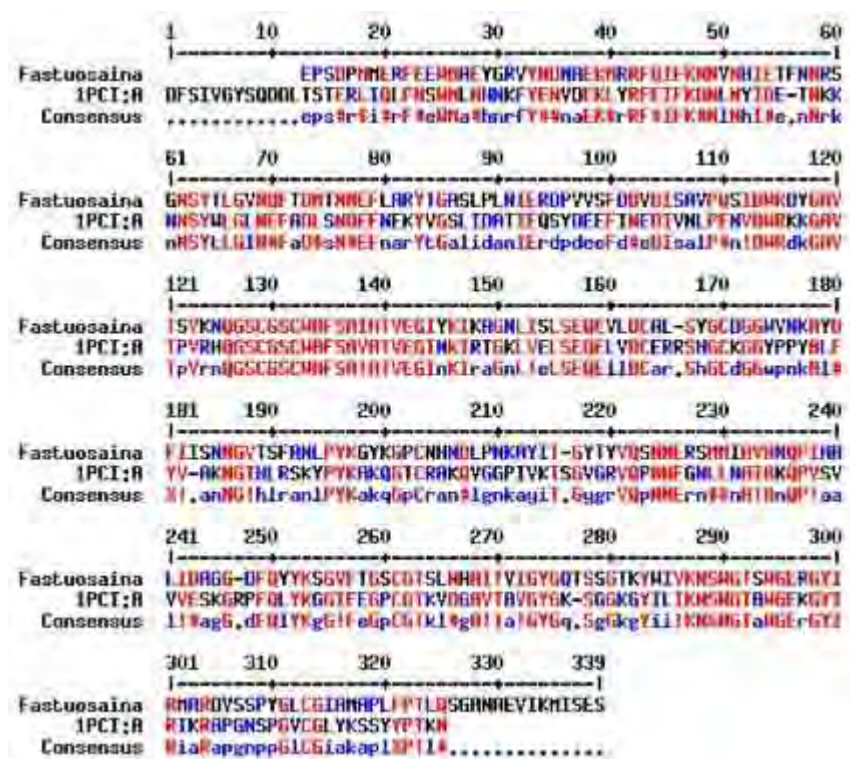


Figura 63. Alinhamento da fastuosaina, com o molde pro-caricaína, (1PCI).

A figura 63, mostra o alinhamento da pró-fastuosaina com a pró-caricaína. Como podemos observar, existe uma identidade de 40,12%, o que confere à modelagem uma confiabilidade.

Muito parecido com a pro-caricaína, a pró-fastuosaina também possui o segmento (motivo) ERIFNIN. Na pró-caricaína, segundo GROVES et al., (1996), ele se localiza entre os resíduos Glu-38 a Asn-57 (Glu-X-X-X-Arg-X-X-Ile-Phe-X-X-Asn-X-X-X-Ile-X-X-X-Asn), na pró-fastuosaina se localiza entre os resíduos Glu-26 a Asn-43, (Glu-X-X-Arg-X-X-X-Ile-Phe-X-X-Asn-X-X-X-Ile-X-X-X-Asn).

A figura 64, mostra a estrutura terciária da pró-fastuosaina, de vários ângulos, destacando os resíduos da tríade catalítica do sítio catalítico, e o resíduo do início da fastuosaina madura, onde podemos observar que a pró-região, passa na frente da fenda catalítica impedindo o acesso do substrato.

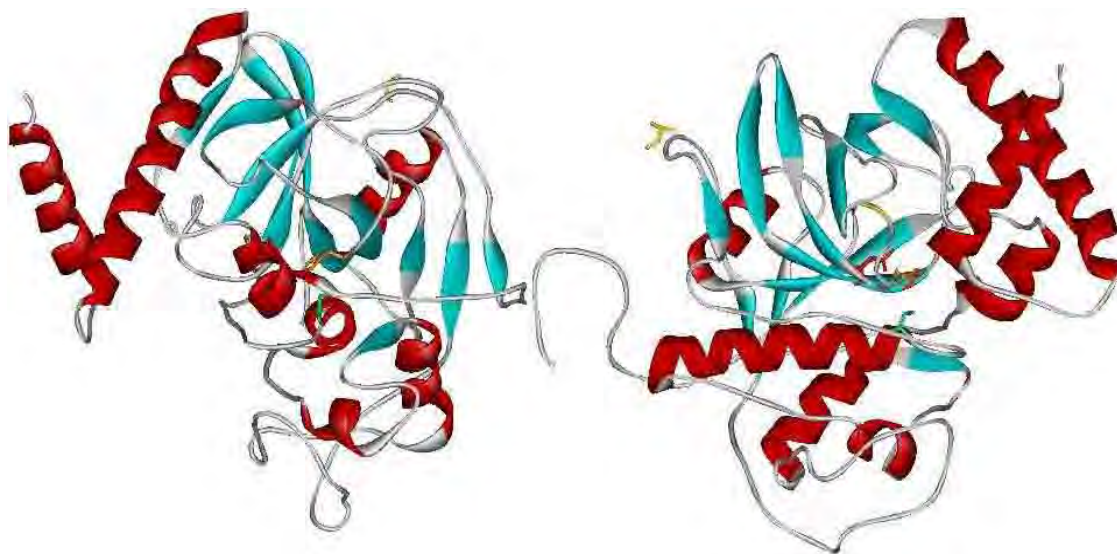


Figura 64 a) frente; b) lado 1. Estrutura terciária da pró-fastuosaina, utilizando como modelo a pró-caricaina (1PCI). Os resíduos da tríade catalítica estão destacados, e o resíduo em amarelo e referente a Ala, que corresponde ao início da fastuosaina madura.

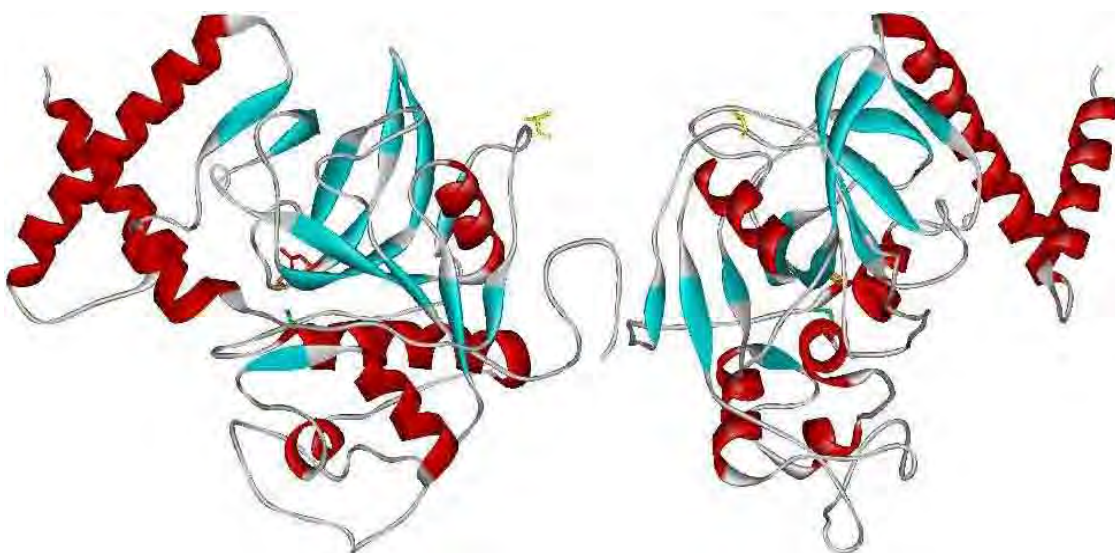


Figura 64 c) lado 2; d) fundo. Estrutura terciária da pró-fastuosaina, utilizando como modelo a pró-caricaina (1PCI). Os resíduos da tríade catalítica estão destacados, e o resíduo em amarelo e referente a Ala, que corresponde ao início da fastuosaina madura.

Os resíduos da tríade catalítica estão mostrados em amarelo, a Cys-26, em vermelho, a His-158, e em azul, Asn-175.

Observando a estrutura tridimensional da fastuosaina na figura 64, vimos que a pro-região é constituída por 3 α -hélices, semelhante à pro-caricaína (GROVES et al., 1996), sendo chamada de α -1, iniciando no N-terminal composta pelos resíduos de 3 a 17. Na pro-caricaína esta α -hélice é composta pelos resíduos 13 a 29, (GROVES et al., 1996), e a α -2, a maior α -hélice, composta pelos resíduos 25 a 46 na pro-fastuosaina, e na pro-caricaína é composta pelos resíduos 35 a 59, (GROVES et al., 1996). A α -3, a menor α -hélice composta pelos resíduos 59 e 60 e 64 a 71, na pro-fastuosaina, e na pro-caricaína pelos resíduos 74 a 82, (GROVES et al., 1996).

Também temos a presença de uma folha- β , que compreende os resíduos 51 a 55, na pro-fastuosaina, semelhante a pro-caricaína, resíduos 62 a 66 (GROVES et al., 1996).

Na figura 65, temos o gráfico de Ramachandran da pró-fastuosaina.

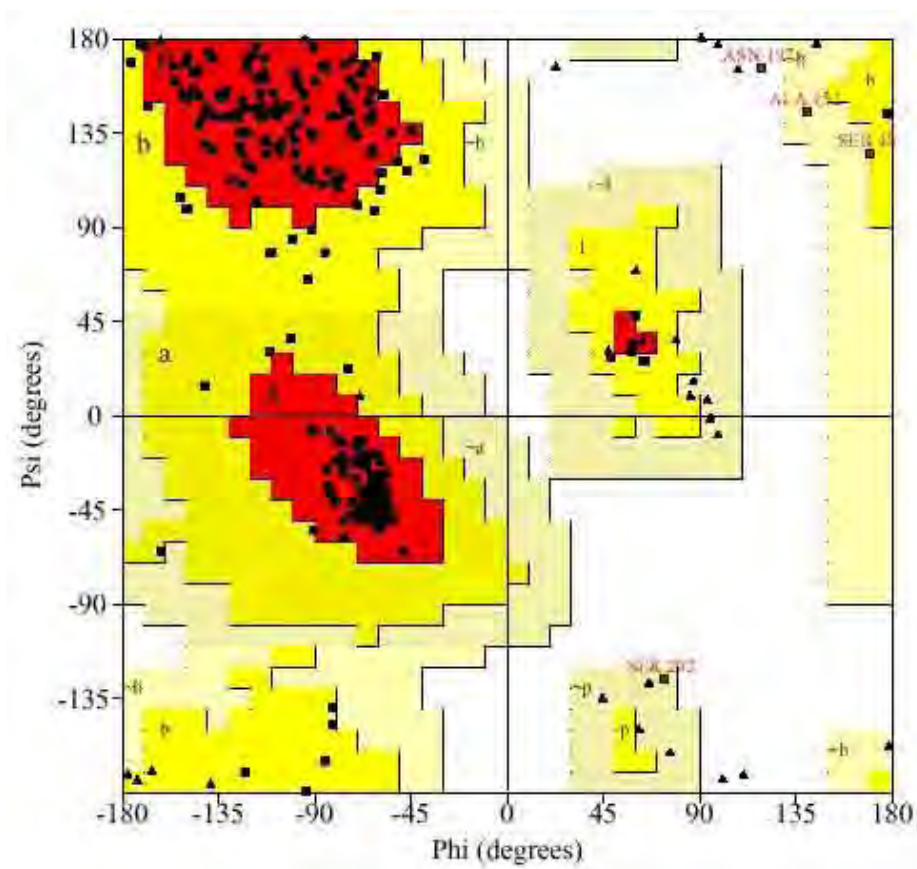


Figura 65. Gráfico de Ramachandran, gerado a partir das coordenadas tridimensionais da pró-fastuosaina.

O gráfico de Ramachandran acima, mostra que o modelo gerado está muito bom, pois há somente um resíduo fora das regiões favoráveis, (este resíduo de aminoácido se encontra na superfície da molécula) o que representa 0,4%, enquanto 86,8% dos resíduos de aminoácidos estão na região mais favorável, 11,8% na região adicionalmente favorável, e 1,1% na região generosamente favorável.

Também realizamos a modelagem molecular da fastuosaina com os inibidores E-64 e E-64-C, utilizando as estruturas da actinidina (código PDB ID: 1AEC) e papaína (código PDB ID: 1PE6), as quais foram cristalizadas com os respectivos inibidores E-64 e E-64-C.

A figura 66, mostra o alinhamento de sequência dos resíduos de aminoácidos da fastuosaina, com actinidina.

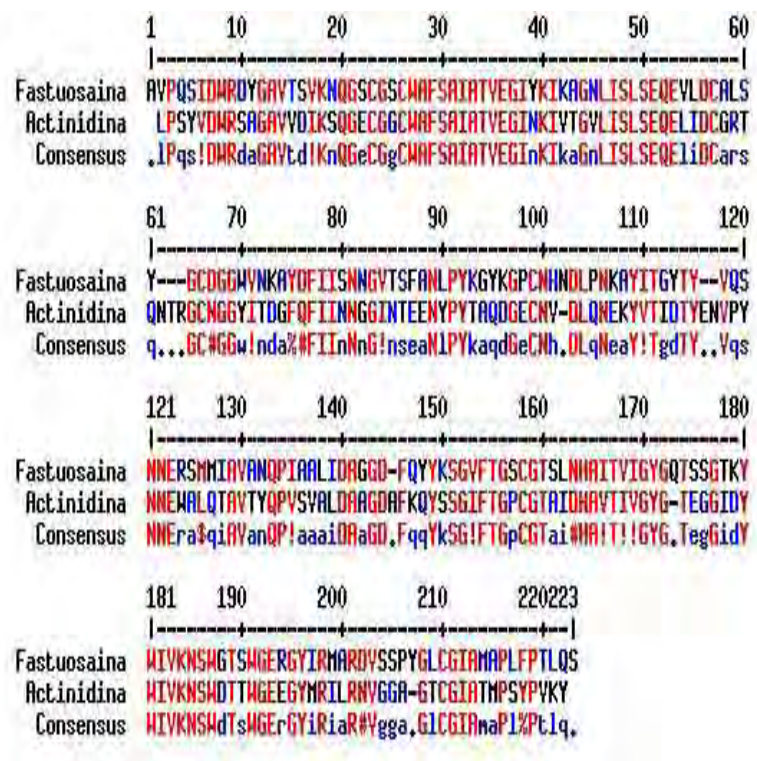


Figura 66. Alinhamento dos resíduos de aminoácidos da fastuosaina com o molde actinidina.

Existe uma grande identidade dos resíduos que compõem a estrutura primária destas duas enzimas, a identidade foi de 52,07%.

A figura 67, mostra o modelo tridimensional do potencial eletrostático de superfície da fastuosaina gerado com o inibidor E-64.

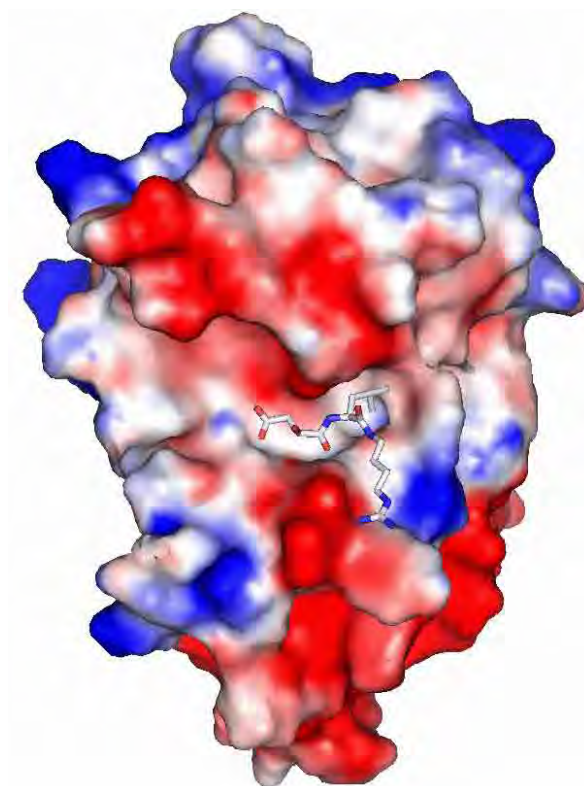


Figura 67. Potencial eletrostático de superfície da fastuosaina, modelada usando como molde a actinidina, com o inibidor E-64. Figura gerada a partir das coordenadas tridimensionais no programa computacional Pymol.

Como podemos observar, as regiões em azul correspondem às cargas positivas, as regiões em vermelho às cargas negativas e em branco são regiões neutras. O inibidor pode vir a fazer ligações com a enzima nas regiões de cargas opostas, como por exemplo, na porção inferior onde há o predomínio de cargas negativas na enzima e o inibidor apresenta carga positiva.

A figura 68, mostra o gráfico de Ramachandran para o modelo gerado da fastuosaina com o inibidor E-64.

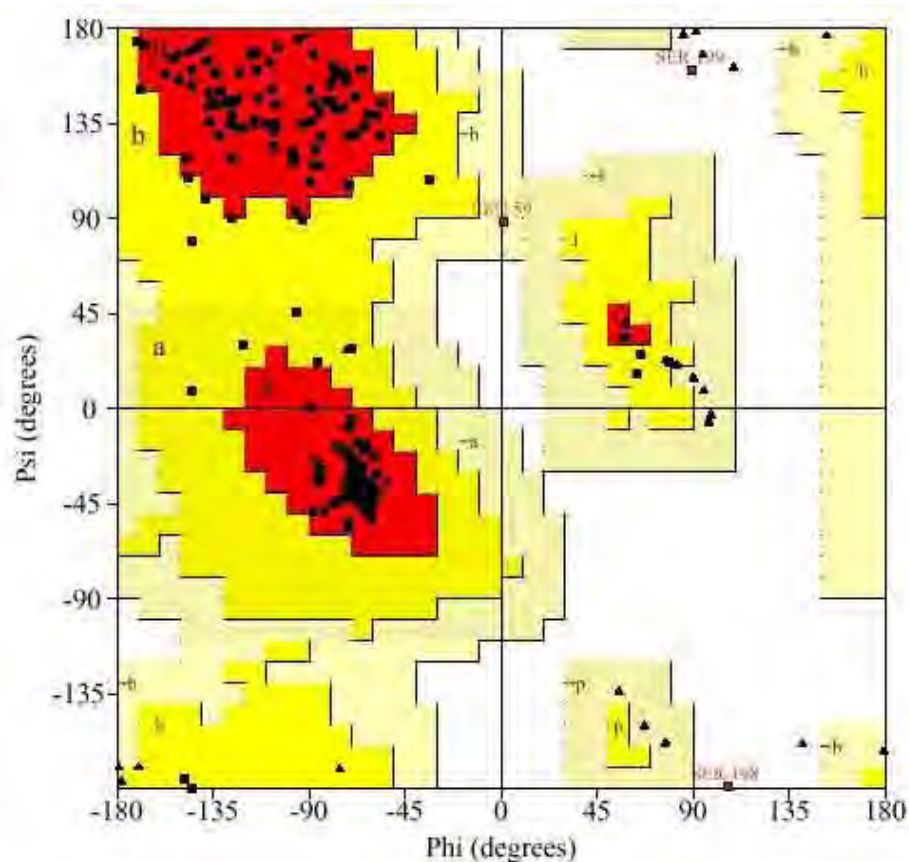


Figura 68. Gráfico de Ramachandran, gerado a partir das coordenadas tridimensionais da fastuosaina complexada com o inibidor E-64.

O gráfico gerado mostra dois resíduos de aminoácidos que estão fora das regiões permitidas, estes resíduos são: Ser-198 e Ser-199, que se encontra na superfície da molécula, estes dois resíduos de aminoácidos corresponde a 1,1% dos resíduos, e 89,7% dos resíduos se encontram na região favorável.

A figura 69, mostra o alinhamento das seqüências de aminoácidos da fastuosaina com a enzima molde papaína, complexada com o inibidor E-64-c.

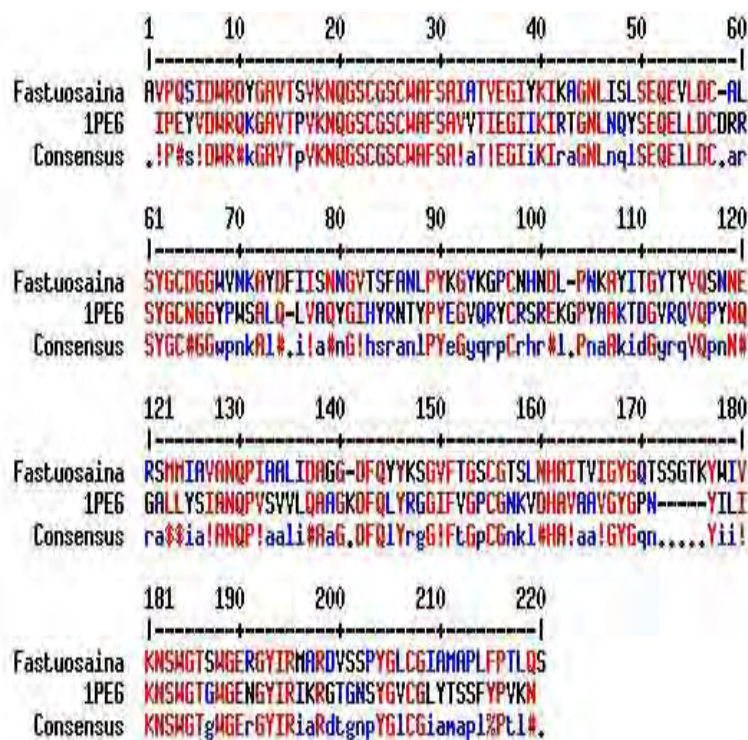


Figura 69. Alinhamento dos resíduos de aminoácidos da fastuosaina com o seu molde papaina complexada com o inibidor E-64-c.

Esta figura mostra que a fastuosaina também possui uma alta identidade com o seu modelo, esta identidade chega a 44,70%, como podemos observar na linha do consensus em vermelho.

A figura 70, mostra o potencial eletrostático de superfície da fastuosaina, que foi gerado pelo programa computacional Pymol, na presença do inibidor E-64-c.

Na tabela 9, temos os valores de desvios de r.m.s. “*root mean square*”, calculados a partir da sobreposição dos Carbonos- α , para a enzima fastuosaina, utilizando as enzimas: 9PAP, 1MEG, 1PPP, 1CQD e 1PE6, (códigos PDB).

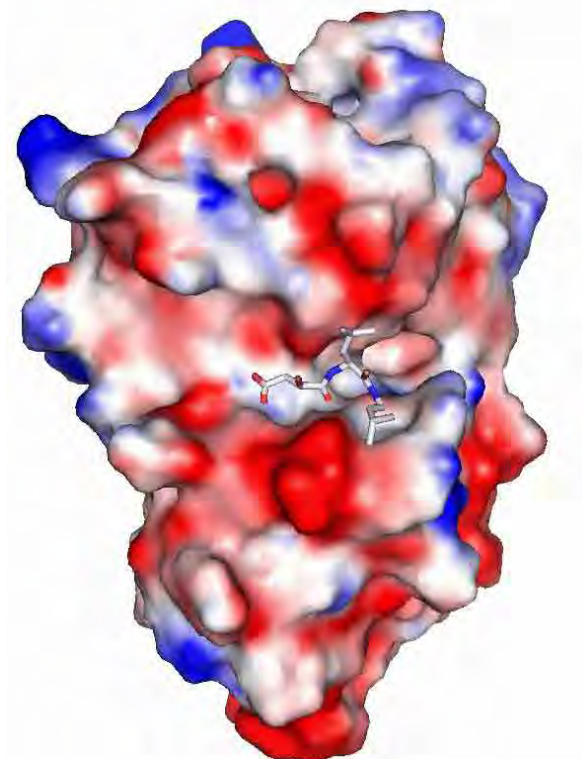


Figura 70. Potencial eletrostático de superfície da enzima fastuosaina modelada usando como molde a papaína complexada com o inibidor E-64-c. Figura gerada a partir das coordenadas tridimensionais no programa computacional Pymol.

Tabela 9. Valores dos desvios de r.m.s., para a enzima fastuosaina, comparado com outras cisteíno-peptidases, a partir dos Carbonos- α .

Enzimas modelo (código PDB)	r.m.s. Fastuosaina
9 PAP	0,36Å
1 MEG	0,63Å
1 PPP	0,50Å
1 CQD	0,77Å
1 PE6	0,43Å

Os valores dos desvios de r.m.s., dão uma noção de quanto a estrutura obtida por modelagem molecular está próxima das estruturas resolvidas por cristalografia; os valores obtidos estão abaixo de 1Å, valores coerentes, já que valores acima de 1Å já foram observados para análises resolvidas por cristalografia.

A tabela 10, mostra valores de desvios de r.m.s. para a pro-fastuosaina, calculado utilizando outras pro-cisteíno-peptidases, a partir da sobreposição dos Carbonos- α .

Tabela 10. Valores de r.m.s. da Pro-fastuosaina, calculados a partir de outras Pro-cisteíno-peptidases, para os Carbonos- α .

Enzimas código PDB:	r.m.s. Fastuosaina
1 PCI	0,78Å
1 CJL	1,53Å
7 PCK	1,06Å

Os valores obtidos revelam que a Fastuosaina possui mais identidade com a enzima 1 PCI, seguido pela 7PCK e por fim a 1 CJL.

4.12 Obtenção da estrutura tridimensional das enzimas ananaina e Bromelina do Talo, através da técnica de modelagem.

Através da sequência primária das enzimas Bromelina do Talo, RITONJA, et al., 1989 e da Ananaina, LEE, et al., 1997, realizamos a modelagem para obter a estrutura terciária de ambas enzimas.

Na figura 71, temos o alinhamento da Ananaina com a Papaína (código PDB ID: 9PAP). Os resíduos dos aminoácidos em vermelho são conservados, e aqueles em azul são os não conservados. Para este alinhamento obtivemos 45% de identidade.

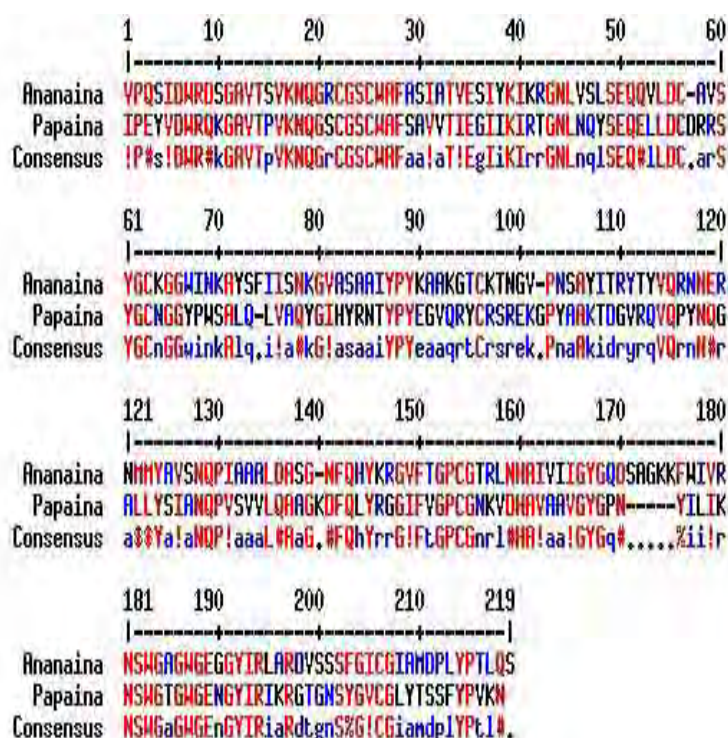


Figura 71. Alinhamento dos resíduos de aminoácidos da ananaina com o molde papaína.

A figura 72, mostra a estrutura terciária da ananaina, de vários ângulos, destacando os resíduos da tríade catalítica (Cys-25 em amarelo, His-157 em vermelho e Asn-178 em azul).

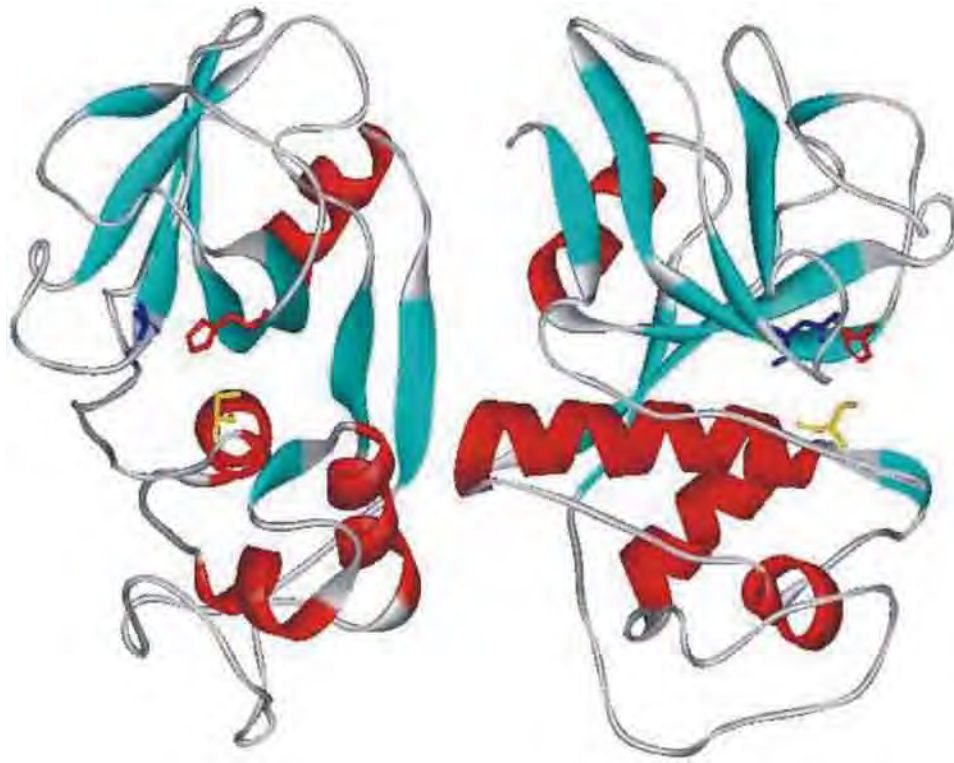


Figura 72 a) frente; b) lado 1. Estrutura terciária da ananaína, utilizando como molde a papaína (9PAP). Os resíduos da tríade catalítica são mostrados, eles são: Cys-25 (amarelo), His-158 (vermelho) e Asn-178 (azul).

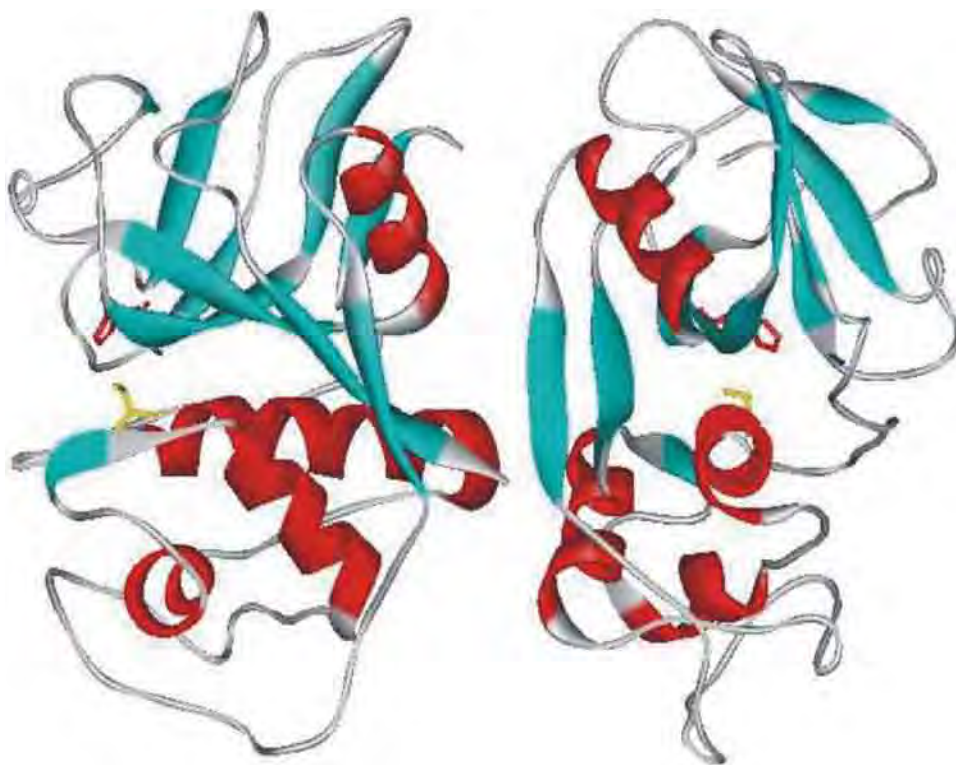


Figura 72 c) lado 2 d) fundo. Estrutura terciária da ananaína, utilizando como molde a papaína (9PAP). Os resíduos da tríade catalítica são mostrados, eles são: Cys-25 (amarelo), His-158 (vermelho) e Asn-178 (azul).

A estrutura da ananaína mostra dois domínios, um caracterizado pela presença da estrutura secundária α -hélice e o outro domínio pela estruturas folhas- β .

Na figura 73, temos o gráfico de Ramachandran, gerado para a estrutura terciária da ananaína.

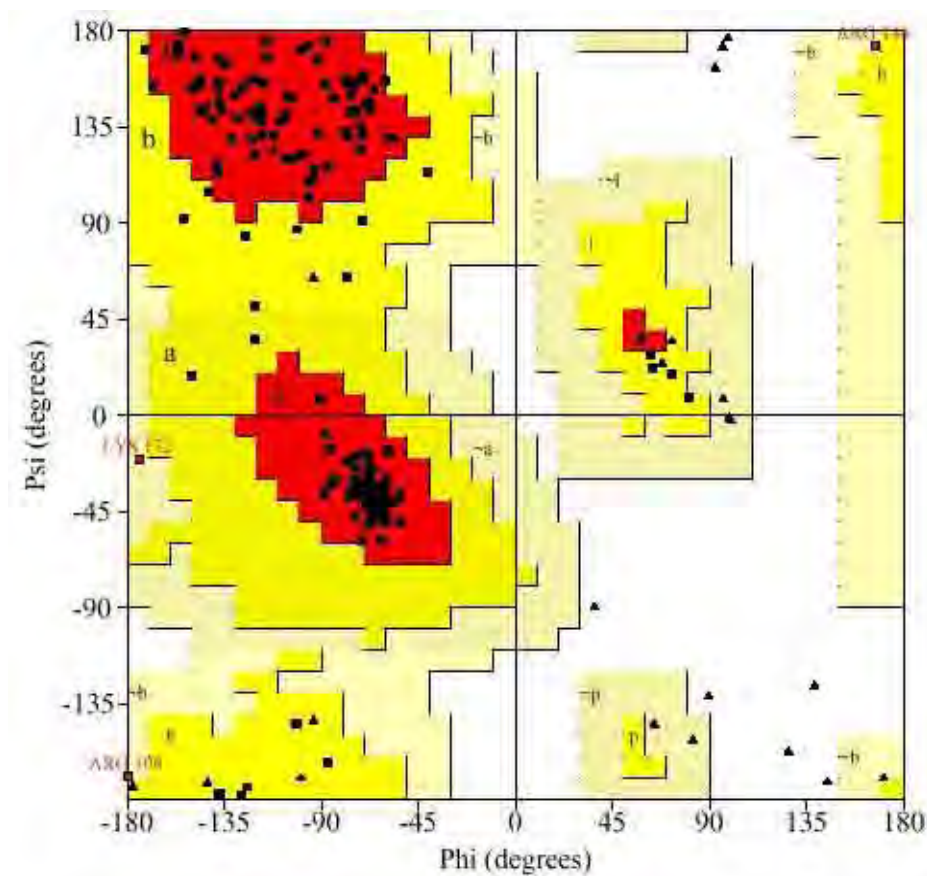


Figura 73. Gráfico de Ramachandran gerado a partir das coordenadas tridimensionais da ananaína.

Os 87,4% dos resíduos encontram nas regiões muito favorável, 10,5% nas regiões favorável e 1,6% na regiões generosamente favorável.

Também realizamos a modelagem molecular da ananaína com os inibidores E-64, utilizando como modelo a actinidina, (código PDB ID: 1AEC).

A figura 74, mostra o alinhamento dos resíduos de aminoácidos da ananaína com a enzima actinidina. O valor de identidade para este alinhamento foi de 47,29%.

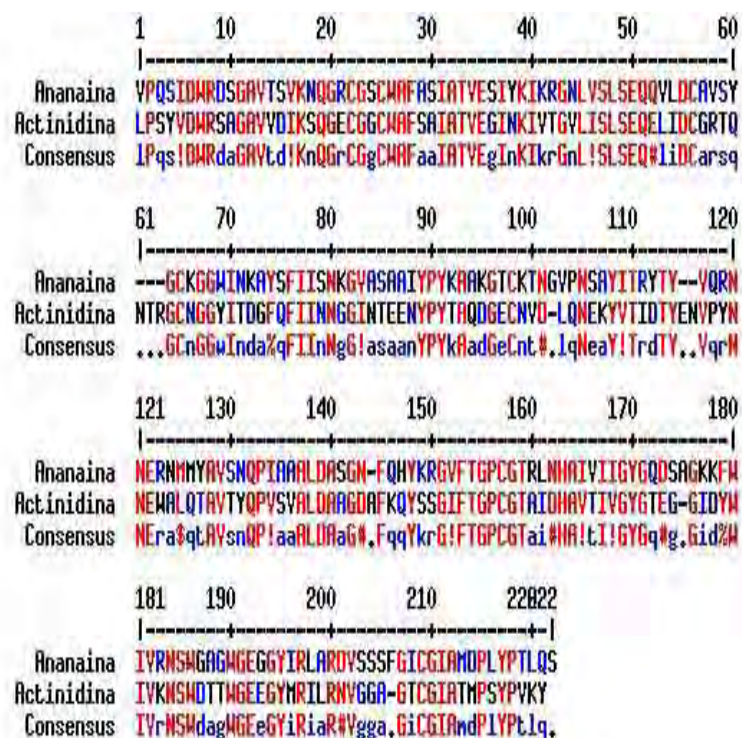


Figura 74. Alinhamento dos resíduos de aminoácidos da ananaina como molde actinidina.

A figura 75, mostra o potencial eletrostático de superfície da Ananaína, que foi gerado pelo programa computacional Pymol, na presença do inibidor E-64.

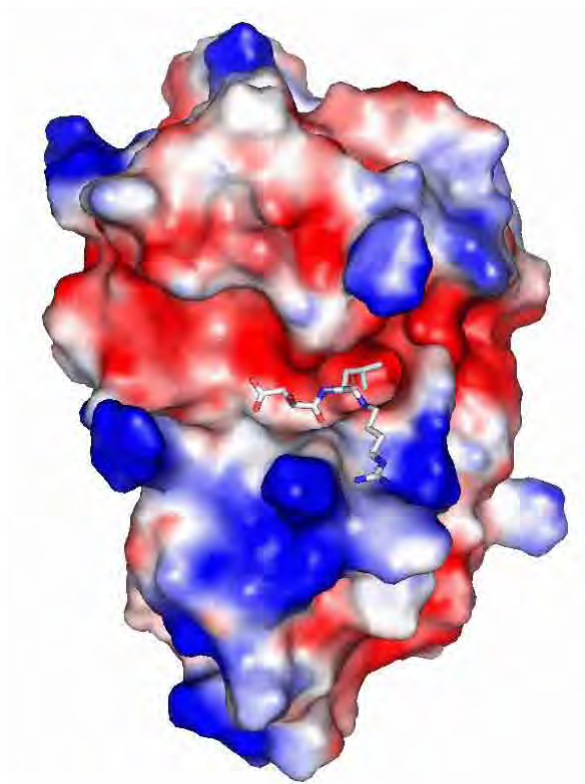


Figura 75. Potencial eletrostático de superfície da ananásina modelada usando como molde a actinidina, com o inibidor E-64. Figura gerada a partir das coordenadas tridimensionais no programa computacional Pymol.

Como podemos observar a região do sítio catalítico há um predomínio de cargas negativas, onde as cargas positivas do inibidor interagem com os resíduos de aminoácidos, e assim bloqueia a entrada de substratos no sítio catalítico.

A figura 76, mostra o gráfico de Ramachandran da ananásina com o inibidor E-64.

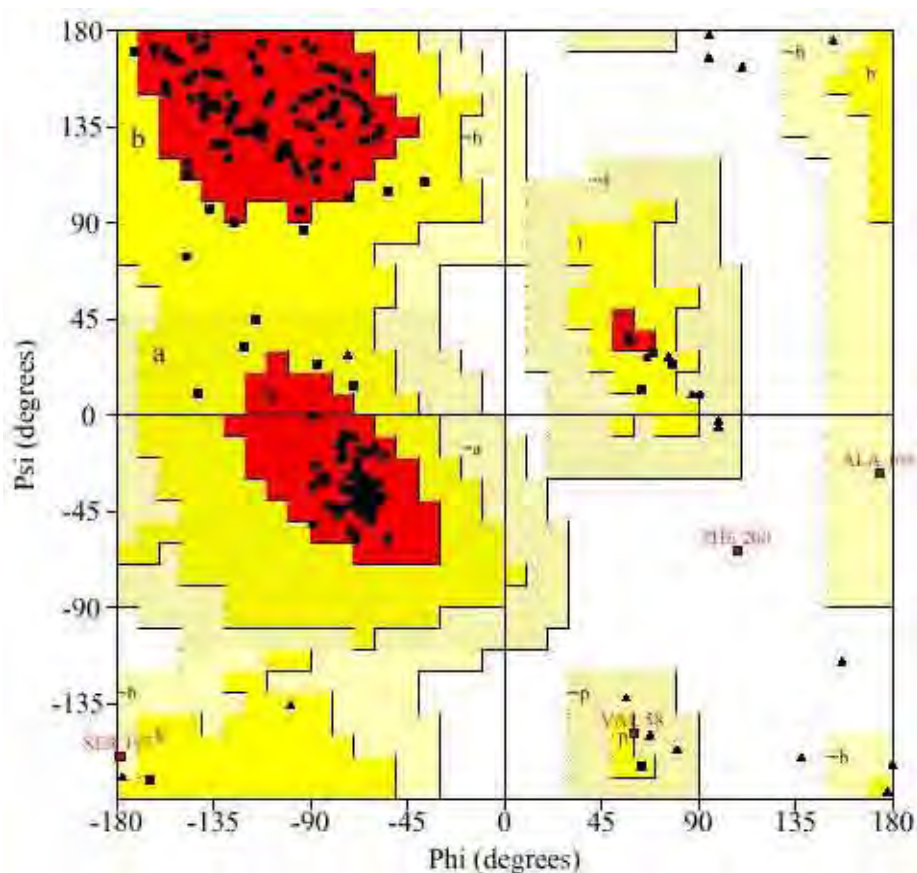


Figura 76. Gráfico de Ramachandran gerado a partir das coordenadas tridimensionais da ananaína, modelada usando a actinidina como molde.

O resíduo de aminoácido Phe-200 está fora das regiões permitidas, (encontrado na superfície da molécula, no domínio da folha- β), representando em termos de porcentagem 0,5% do total dos resíduos da proteína. Dos 217 resíduos de aminoácidos da enzima 89,1% destes se encontram na região permitida, 8,7% nas regiões favoráveis e 1,6% nas regiões generosamente favoráveis.

A figura 77, mostra o alinhamento dos resíduos de aminoácidos da ananaína com a enzima 1PE6, complexada com o inibidor E-64-c.

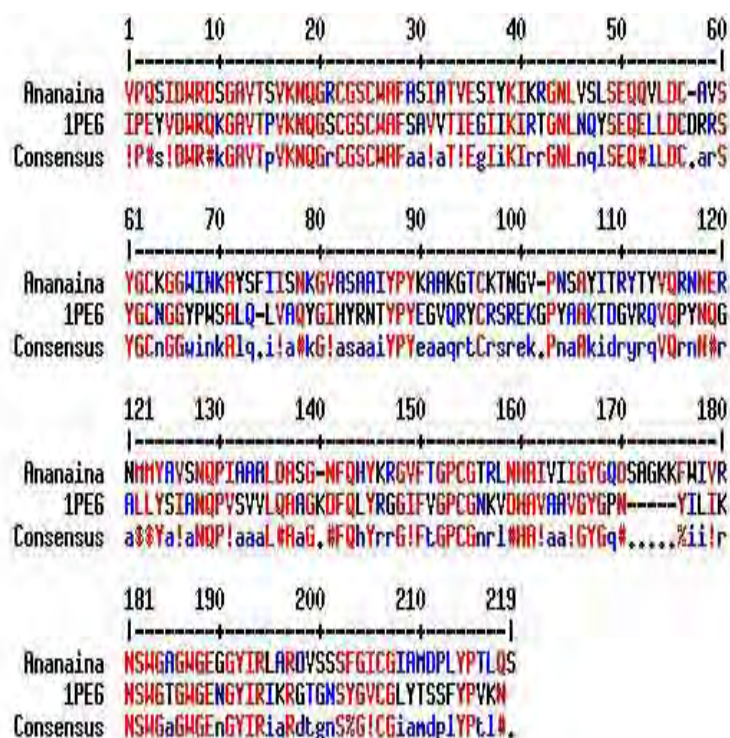


Figura 77. Alinhamento dos resíduos de aminoácidos da ananaina como o molde papaína 1PE6.

No alinhamento dos resíduos de aminoácidos da ananaina com a papaína complexada com o inibidor E-64-c, obtivemos a uma identidade de 42,13%.

A figura 78, mostra o potencial eletrostático de superfície da enzima Ananaina, complexada com o inibidor E-64-c.

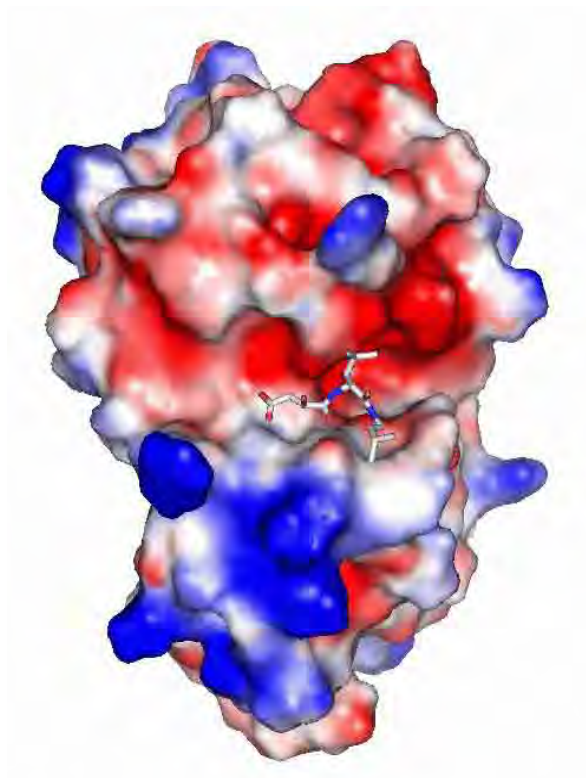


Figura 78. Potencial eletrostático de superfície da ananaina modelada usando a papaína como molde, complexada com o inibidor E-64-c. A figura foi gerada a partir das coordenadas tridimensionais no programa computacional Pymol.

A parte carregada positiva do inibidor pode interagir com resíduos carregados negativamente do sítio catalítico da enzima, resultando assim na ligação à enzima.

A figura 79, mostra o gráfico de Ramachandran gerado para estrutura terciária da ananaina complexada com o inibidor E-64-c.

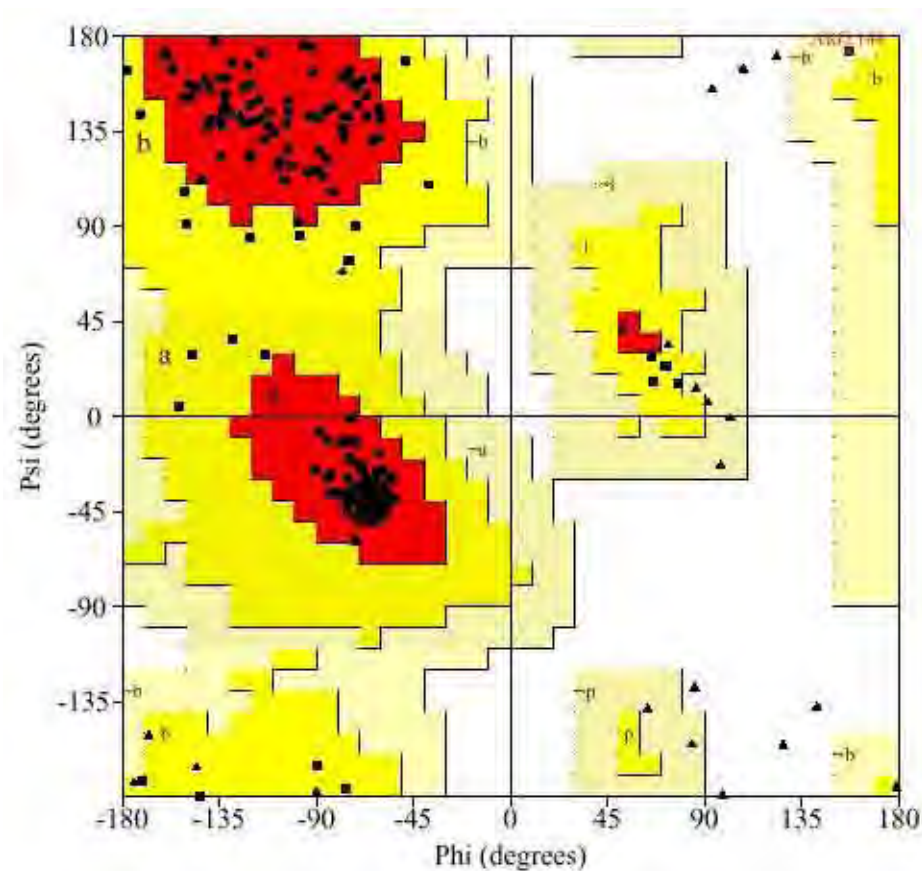


Figura 79. Gráfico de Ramachandran gerado a partir das coordenadas tridimensionais da ananaseína.

Analisando pela figura 79, nenhum dos resíduo de aminoácido da enzima esta fora das regiões permitidas, e do total dos 217 resíduos de aminoácidos desta enzima, 160 se encontra na região permitida com um total de 87,4%.

A figura 80 mostra o alinhamento da seqüência primária da bromelina do talo com a papaína (9PAP).

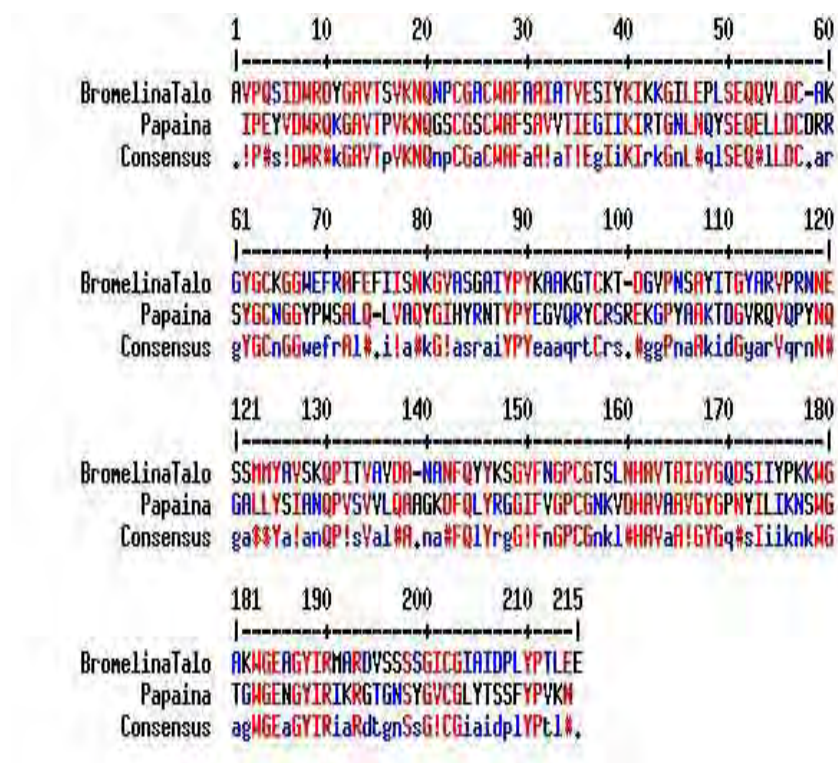


Figura 80. Alinhamento dos resíduos de aminoácidos da bromelina do talo como o molde papaina.

O alinhamento da sequência primária da bromelina do talo com a papaina nos forneceu uma identidade de 40,56% (em vermelho) dos resíduos de aminoácidos.

A figura 81, mostra a estrutura terciária da bromelina do talo gerada através do molde papain a 9PAP.

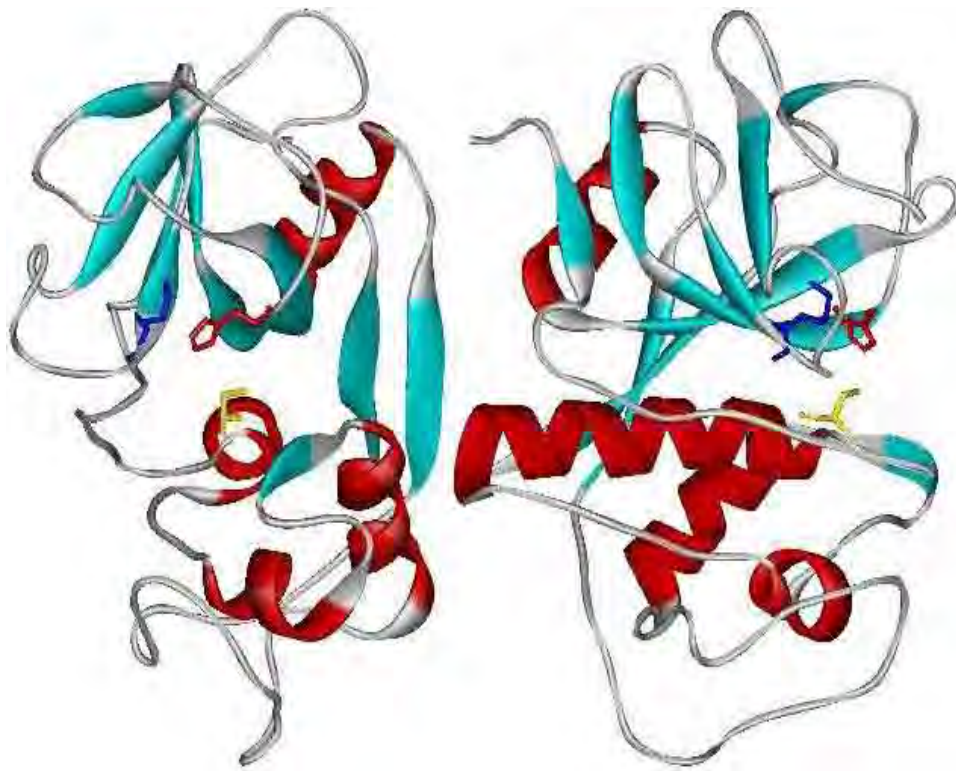


Figura 81 a) frente; b) lado 1. Estrutura terciária da bromelina do talo, utilizando como molde a papaína (9PAP). Os resíduos em destaque são referentes a tríade catalítica, estes resíduos são: Cys-26 (amarelo), His-158 (vermelho) e Lys-174 (azul).

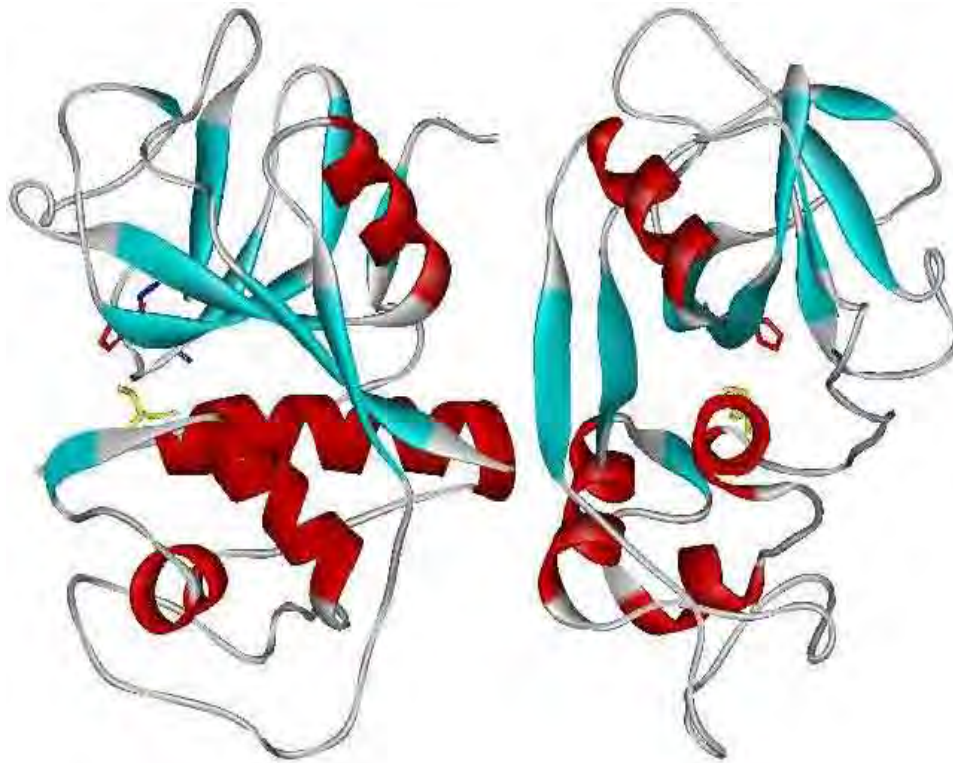


Figura 81 c) lado 2; d) fundo. Estrutura terciária da bromelina do talo, utilizando como molde a papaína (9PAP). Os resíduos em destaque são referentes a tríade catalítica, estes resíduos são: Cys-26 (amarelo), His-158 (vermelho) e Lys-174 (azul).

A figura 82, mostra o gráfico de Ramachandrann do modelo gerado para a enzima bromelina do talo, utilizando como molde a papaína.

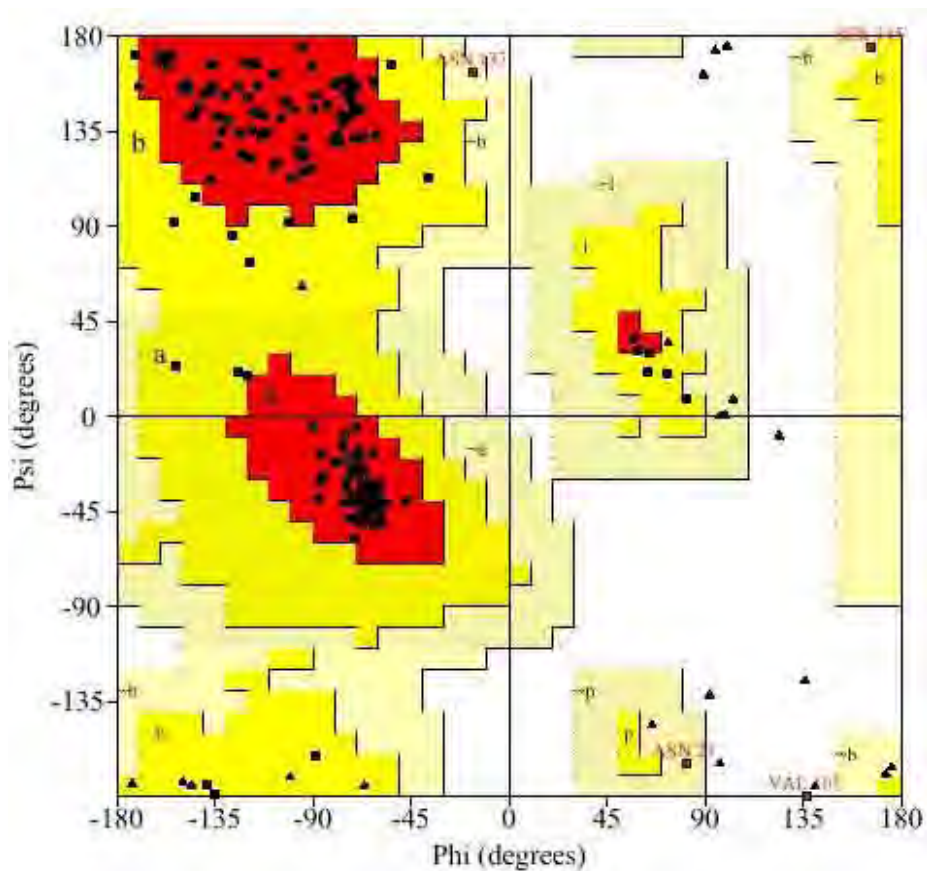


Figura 82. Gráfico de Ramachandran gerado a partir das coordenadas tridimensionais da bromelina do talo.

Pela figura 82, observa-se que o resíduo de aminoácido Val-101, está fora das regiões permitidas, (este resíduo se encontra na superfície da molécula), o que representa 0,6% dos resíduos desta enzima. Temos 87,6% dos resíduos de aminoácidos na região permitida.

A figura 83, mostra o alinhamento dos resíduos de aminoácidos da bromelina do talo com o modelo actinidina (1AEC).

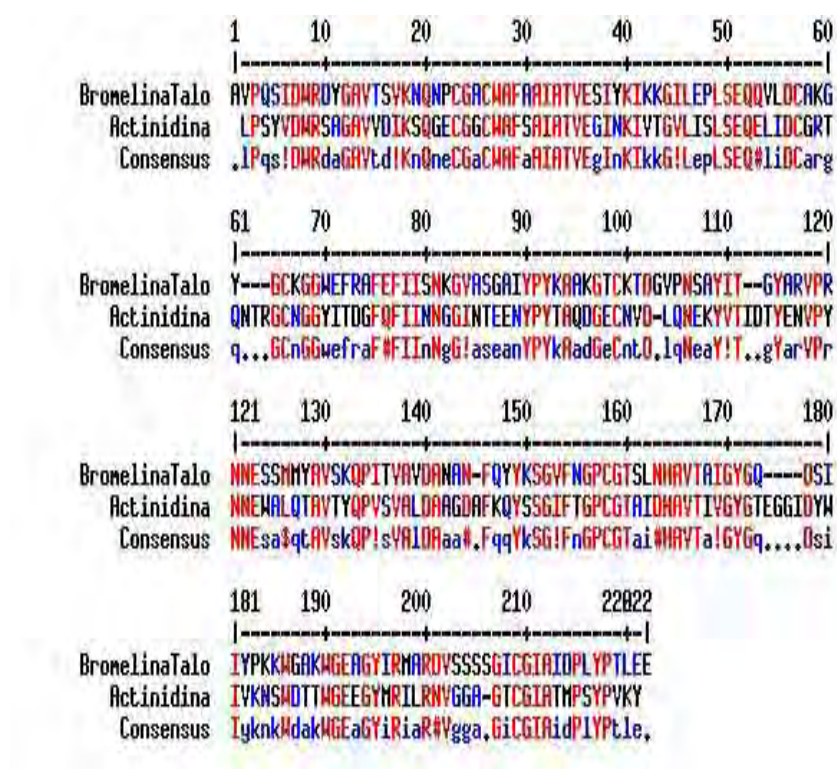


Figura 83. Alinhamento dos resíduos de aminoácidos da bromelina do talo com o molde actinidina.

A figura 84, mostra o potencial eletrostático de superfície da enzima bromelina do talo complexada com o inibidor E-64.

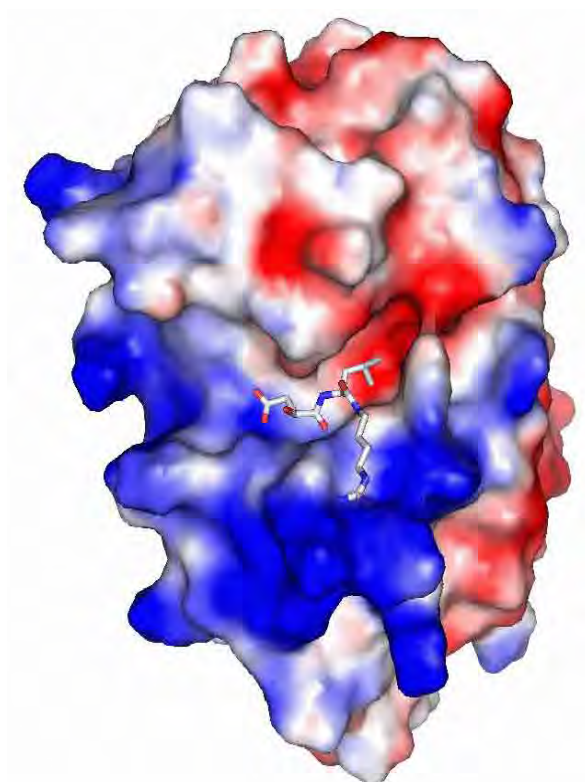


Figura 84. Potencial eletrostático de superfície da bromelina do talo, modelada usando a actinidina como molde, complexada com o inibidor E-64. A figura foi gerada a partir das coordenadas tridimensionais no programa computacional Pymol.

Observa-se que o inibidor pode vir a fazer ligação com as cargas positivas da enzima, que se encontram fora do sítio catalítico.

Na figura 85, observamos o gráfico de Ramachandrann da enzima bromelina do talo complexada com o inibidor E-64.

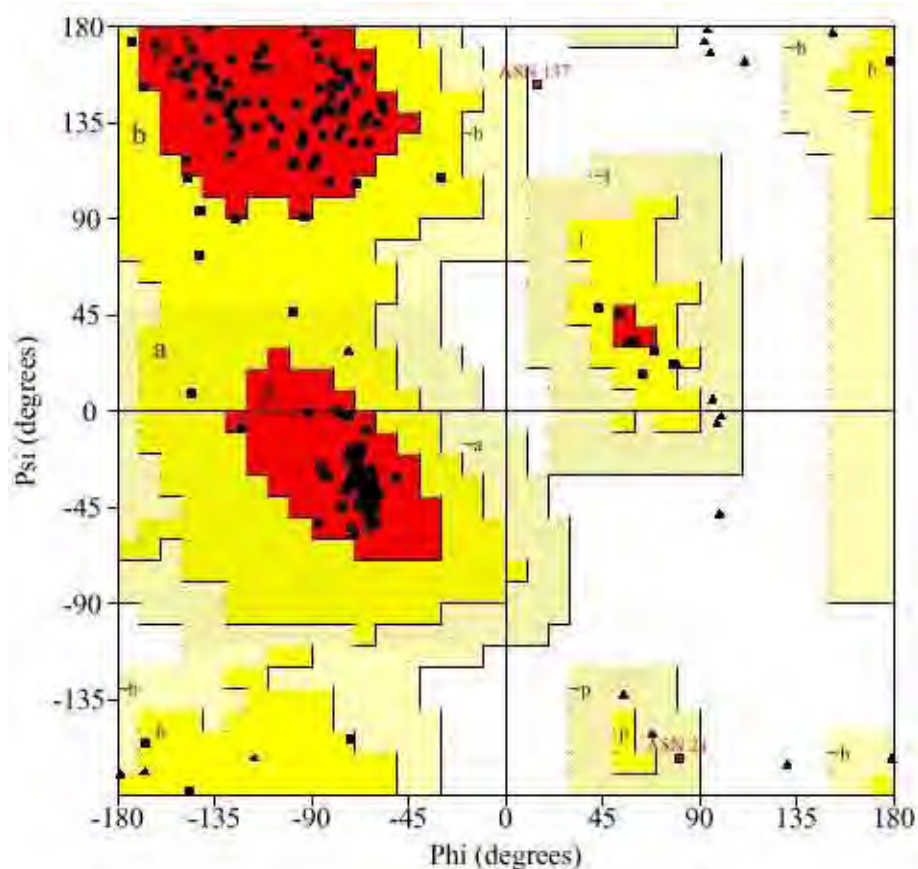


Figura 85. Gráfico de Ramachandran gerado a partir das coordenadas da estrutura tridimensional da bromelina do talo, modelada usando actinidina como molde.

No gráfico da figura 85, podemos observar que o resíduo Asn-137, está fora das regiões permitidas, (este resíduo se encontra na superfície da molécula), com uma porcentagem de 0,6% dos resíduos da enzima, e 89% dos resíduos estão na região permitida.

Na figura 86, mostra o alinhamento da seqüência primária da enzima bromelina do talo com o molde 1 PE6, a qual é complexada com o inibidor E-64-c.

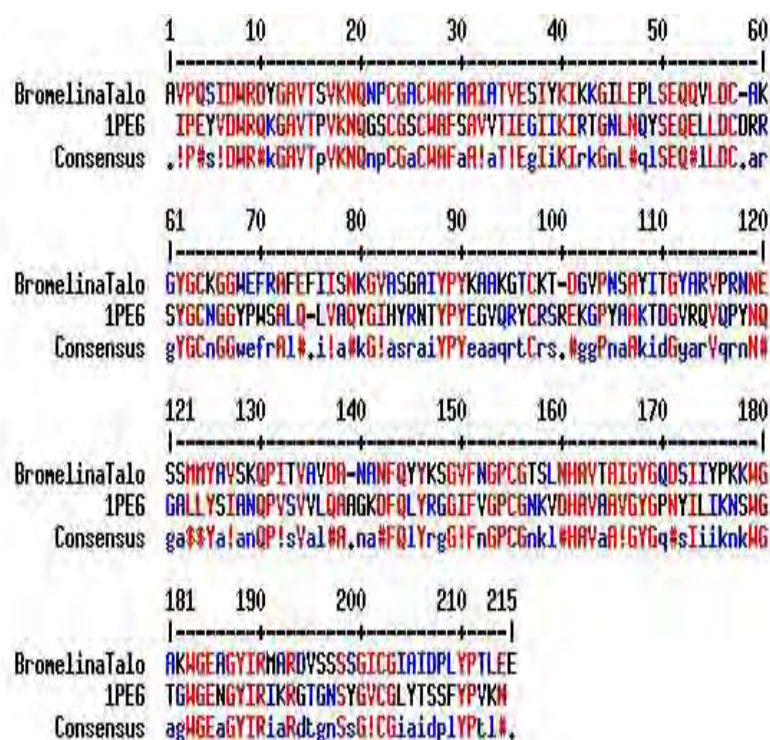


Figura 86. Alinhamento dos resíduos de aminoácidos da bromelina do talo com o molde papaína (1PE6).

O alinhamento da bromelina do talo com a Papaína (1PE6), nos forneceu uma identidade de 40,37%.

A figura 87, mostra o potencial eletrostático de superfície da enzima bromelina do talo com o inibidor E-64-c.

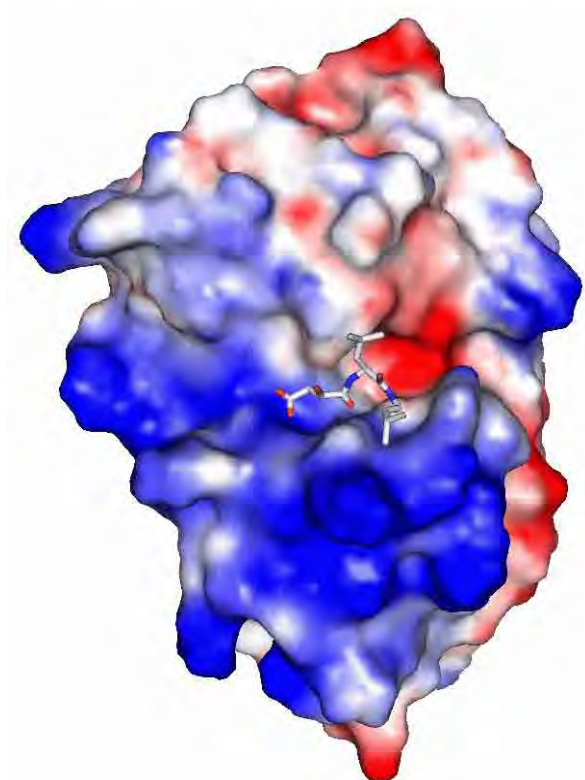


Figura 87. Potencial eletrostático de superfície da bromelina do talo, modelada usando a papaína como molde, complexada com o inibidor E-64-c. Figura gerada a partir das coordenadas tridimensionais no programa computacional Pymol.

Na figura 87 podemos observar que o inibidor E-64-c, pode vir a fazer ligações com os resíduos de aminoácidos da enzima próximo do sítio catalítico (resíduos positivos).

A figura 88, mostra o gráfico de Ramachandran para a enzima bromelina do talo complexada com o inibidor E-64-c.

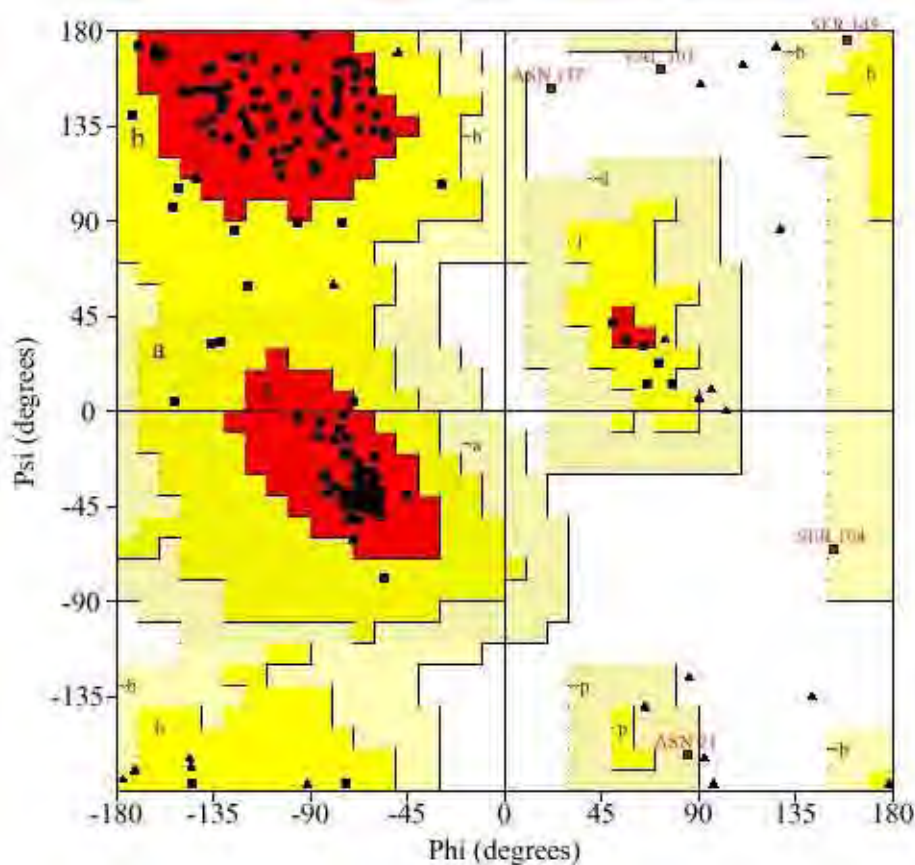


Figura 88. Gráfico de Ramachandran gerado a partir das coordenadas tridimensionais da bromelina do talo.

No gráfico 88, podemos observar que os resíduos Val-101 e Asn-137, estão fora das regiões permitidas, (estes resíduos se encontram na superfície da molécula), com uma porcentagem de 1,1% dos resíduos da enzima, e 87% dos resíduos estão na região permitida.

A tabela 11, mostra os valores do desvios de r.m.s., calculados para as enzimas bromelina do talo e ananaiína, utilizando outras estruturas cristalizadas de cisteíno-peptidases.

Tabela 11. Valores de r.m.s. da bromelina do talo e da ananás, calculados a partir de outras pro-cisteíno-peptidases, através dos Carbonos- α .

Enzimas PDB ID:	d.r.m.s. Brom. Talo	Enzimas PDB ID:	d.r.m.s. Ananás
9PAP	0,79Å	9PAP	0,92Å
1PE6	0,48Å	1PE6	0,55Å
1PPP	0,51Å	1PPN	0,63Å
1PPN	0,51Å	1PPP	0,67Å
1YAL	0,60Å	1IAL	0,69Å
1PPO	0,60Å	1MEG	0,69Å
1CQD	0,76Å	1PPO	0,75Å

5. DISCUSSÃO.

Segundo ROWAN et al., (1994) as endopeptidases do abacaxi exibem um perfil de pH ótimo próximo do neutro. Um gráfico do K_{cat}/K_M contra o pH para a papaína, nos dá uma curva em forma de sino, com uma atividade ótima ao redor de pH 6,0. Isto é causado pelo estado de ionização da His-159 e Cys-25, com os valores de pK_a de 4,2 e 8,2 (WHITAKER, 1972 e FERSHT, 1995)

O pH ótimo da enzima Ervatamina B, uma cisteíno-protease extraída do látex da planta *Ervatamia coronaria*, segundo KUNDU et al., (2000) é de 6 a 6,5, próximo do pH ótimo da papaína.

A resistência da enzima fastuosaina à uréia já havia sido demonstrada em testes de inativação de nucleases na presença deste agente desnaturante, (CABRAL et al., 2000).

Em relação ao efeito do NaCl sobre a atividade catalítica, para as bromelinas foi parecido com o obtido para a enzima Cruzaina segundo os dados de JÚDICE et al. (2001).

Para uma nova endopeptidase isolada dos frutos da *Bromelia hieronymi* Mez., segundo BRUNO et al. (2002), em baixas concentrações de NaCl esta enzima não perde a sua atividade caseinolítica, mas com o aumento da concentração de NaCl para 2,5M ela apresenta uma atividade residual de 52%.

O substrato usado foi o Abz-KLRFSKQ-EDDnp, ou seja, tendo uma Arg na posição P_1 e Phe na P'_1 .

Pela tabela 4 da página 69, as duas bromelinas interagem favoravelmente com Arg e Lys em P_1 , enquanto a fastuosaina e a papaína preferem resíduos apolares nessa posição. Isso sugere que em S_1 as bromelinas tenham um resíduo carregado negativamente, como Asp ou Glu. A blindagem causada pela elevação da

concentração de sal inicialmente enfraquece a interação entre a Arg P_1 e a carga negativa complementar em S_1 .

Quando a concentração de sal aumenta ainda mais, parece operar um mecanismo semelhante ao “*salting-out*”, a concentração de sal diminui significativamente a atividade de água (a_w) e facilita a interação P_1 - S_1 .

Para a fastuosaina e papaína, os dados sugerem que a elevação da concentração de sal favorece a interação hidrofóbica entre P_1 - S_1 , (Arg e um resíduo apolar, respectivamente).

Em relação à estabilidade térmica, segundo BRUNO et al., (2002), a enzima isolada dos frutos da *Bromelia hieronymi* Mez, depois de 2 horas de incubação a 65°C não apresentava mais atividade catalítica. Por outro lado a enzima balansaina, perdeu 20% de sua atividade catalítica depois de 2 horas incubada a 45°C, e a 55°C ela perdeu por volta de 50% no mesmo período de incubação, e a 65°C ela perdeu 70% de sua atividade catalítica depois de ter percorrido 2 horas de incubação segundo PARDO et al., (2000).

Podemos observar que as enzimas fastuosaina e papaína possuem uma maior estabilidade térmica quando comparadas com as bromelinas do talo e do fruto, e também que a maioria das cisteíno peptidases vegetais não suportam temperaturas acima de 55°C, durante um período prolongado.

No que se refere às análises de mapeamento de subsítios, segundo a proposta de SCHECHTER e BERGER, 1967, o sítio catalítico da Papaína liga 7 resíduos de aminoácidos apropriadamente nos subsítios, mas recentemente TURK et al., (2000), propuseram com base em estudos cinéticos e estruturais, que somente 5 subsítios são importantes para ligar os substratos. Os subsítios S_2 , S_1 e S_1' do “bolsão” são importantes para ambas as ligações da cadeia lateral e do “esquelo” principal dos aminoácidos, enquanto que os subsítios S_3 e S_2' , são decisivos

unicamente para a ligação da cadeia lateral dos aminoácidos, (GRZONKA et al., 2001).

A especificidade por Prolina em P_1 , ocorre em poucas enzimas, e esta característica aparece mais para o subsítio S_2 , como é o caso da enzima Ginger GP-I e GP-II, extraída da planta *Zingiber officinale*, segundo CHOI et al. (1999), enquanto KAFEINAH et al. (1998), mostraram que a catepsina K também tem preferência por Prolina em P_2 .

Segundo ROWAN et al. (1988), a bromelina do talo tem preferência pelo substrato Z-Arg-Arg-NH-Mec, ou seja, ela aceita Arg em P_1 , corroborando os com os nossos resultados, e MURACHI, (1969) também mostrou que a bromelina do talo hidrolisa rapidamente o substrato BAEE (Benzoil-L-Arginina etil ester), confirmando que a bromelina do talo prefere Arginina em P_1 .

A papaína mostrou uma preferência por Metionina, seguida por Serina e Arginina, sendo estes resíduos de aminoácidos apolar, polar e carregado positivamente (básico), respectivamente. Portanto, este subsítio não é seletivo, o que também foi relatado por PORTARO et al., (2000). Segundo BERGER e SCHECHTER, (1970), a papaína prefere os resíduos de aminoácidos, Alanina e Glicina em P_1 ; nossos resultados mostra que a papaína também aceita estes resíduos só que com menor afinidade.

A especificidade em P_2 , para a fastuosaina foi por Alanina, seguido por Prolina, ambos resíduos apolares, e segundo CHOI et al., (1999), a enzima Ginger GP-I e GP-II, e outras cisteíno-peptidases preferem em P_2 Prolina, semelhante a fastuosaina.

A bromelina do talo e do fruto apresentaram preferência por Pro em P_2 , semelhante ao observado por CHOI et al., (1999), antes citado. Não houve uma mudança na preferência para este subsítio para estas duas enzimas.

A fastuosaina tem baixa afinidade por Arginina em P_2 , e a bromelina do talo e do fruto por Fenilalanina, ao contrário da papaína que prefere Fenilalanina em P_2 , como já relatado por BERGER e SCHECHTER, (1970), e PORTARO et al., (2000), seguido por Prolina, onde há novamente a preferência por resíduos de aminoácidos apolares.

Como podemos observar, o subsítio S_2 é mais seletivo para estas duas enzimas, pois todas preferem resíduos de aminoácidos apolares, como relatado por PORTARO et al., (2000). Novamente, a papaína mostrou uma maior atividade catalítica seguido pela fastuosaina e por fim a bromelina do talo.

Segundo PORTARO et al., (2000), a papaína prefere em P_3 Fenilalanina, seguido de Leucina, utilizando o substrato Abz-AXFRSQK-EDDnp. Isto veio confirmar o nosso resultado, e ainda segundo este mesmo autor a preferência da papaína por Phe seguido de Leu em P_3 e que no subsítio S_3 da papaína parte dos resíduos deste subsítio é composto por resíduos hidrofóbicos, com por exemplo Tyr-61 e Tyr-67.

A papaína apresentou uma especificidade por Asparagina seguido por Glicina em P'_2 , diferentes dos dados obtidos por PORTARO et al., (2000), As bromelinas do talo e do fruto apresentaram a mesma preferência para este subsítio, ou seja, para os resíduos Arg, Ala e Pro.

A papaína mostrou uma preferência por Asparagina, resultado obtido por PORTARO et al., (2000), seguido por Fenilalanina, observação feita também por PORTARO et al., (2000), onde o autor mostrou que esta enzima tem preferência por resíduos hidrofóbico e polar.

A papaína tem baixa afinidade pelos resíduos de Arginina e Alanina, sendo este último resíduo também não aceito nos experimentos realizados por PORTARO et al., (2000).

Esta preferência por Pro, observado na fastuosaina e bromelina do fruto, não é comum em cisteíno-proteases; pode surgir em P₂ como é o caso da GP-II extraída da *Zingiber officinale*, (CHOI et al.,1999).

A preferência por Tyr na fastuosaina, papaína e bromelina do talo em P₁ é observado na papaína em P₂, segundo SCHECHTER e BERGER, (1967).

Segundo UCHIKOBA et al., (2000), as enzimas fitolacaina G e R e na papaína, o bolsão do subsítio S₂ são formados pelos seguintes aminoácidos na fitolacaina G: Tyr-61; Trp-67; Met-68; His-69; Ala-133; Ser-157; Trp-205 e Ser-207, na fitolacaina R são: Gly-61; Trp-67; Met-68; His-69; Ala-133; Ile-157; Ala-205 e Met-207, na papaína: Tyr-61; Tyr-67; Pro-68; Trp-69; Val-133; Val-157; Ser-205 e Phe-207. Na fastuosaina modelada usando a papaína como molde teríamos: Tyr-61; Trp-67; Val-68; Asn-69; Leu-133; Asn-157; Gly-205 e Ala-207.

Como podemos observar, existe uma grande diferença destes aminoácidos para o bolsão do subsítio S₂, exceto nas posições 61 e 67, onde somente na posição 61 a fitolacaina R é diferente das três enzimas citadas. Esta diferença de resíduos de aminoácidos no subsítio S₂, vem mostrar diferenças na especificidade da fastuosaina com a papaína.

No caso do subsítio S₃, na papaína, é composto pelos resíduos Y-61 e Y-67, enquanto na fastuosaina modelada, temos Y-61 e W-67, o que apresenta uma diferença na composição deste subsítio polar na papaína e polar e apolar na fastuosaina.

O subsítio S₁, que é corresponde ao sítio de catálise, ou seja a tríade catalítica é composto pelos seguintes resíduos de aminoácidos na papaína Cys-25, His-159, Asn-175 e Gln-19, na fastuosaina e composto pelos seguintes resíduos de aminoácidos: Cys-26, His-158, Asn-179 e Gln-20.

No subsítio S₁' a fastuosaina possui os seguintes resíduos de aminoácidos: Ala-136, Asn-158 e Val-177, já a papaína Ala-136, Asp-158 e Trp-177, o que também pode levar a especificidades diferentes, pois temos apenas uma diferença em termos de características química e física dos aminoácidos que compõem este subsítio.

No que se refere à estrutura, as enzimas modeladas sugerem similaridades entre si em relação ao “*folding*”. Os espectros obtidos para a fastuosaina, bromelina do talo e do fruto e da papaína, se enquadram de acordo com o critério proposto por MANAVALANE e CURTIS, (1983), como pertencentes à classe do tipo $\alpha+\beta$.

O que podemos observar com as estruturas obtidas por modelagem molecular, é que elas corroboram, com os dados de CD.

Dados obtidos por ARROYO-REYNA et al., (1994), para a bromelina do talo, também apresentou 2 bandas negativas em 208 e 222nm, semelhantes aos nossos dados. Para a cisteíno-protease Ervatamina C, KUNDU et al. (1999), também mostrou que esta enzima pertence à classe de proteínas do tipo $\alpha+\beta$.

Fizemos também neste trabalho análise da composição de carboidratos.

Segundo VERNET et al. (1990), a região precursora da papaína possui dois potenciais sítios de glicosilação à Asparagina (Asn-X-Ser/Thr), na posição do resíduo 48→(Asn-Asn-Ser) e 19→(Asn-Tyr-Ser).

A bromelina do talo, segundo o autor ISHIHARA et al. (1979) é uma glicoproteína, composta pelos seguintes monossacarídeos: Manose, Fucose, Xilose e N-acetilglicosamina, sendo o oligossacarídeo ligado a um resíduo de Asparagina. Confirmando que a bromelina do talo é uma glicoproteína.

Segundo HARRACH et al. (1995), as proteases da bromelina das frações F4 e F5 contêm Fucose, N-acetilglicosamina, Xilose e Manose na proporção de 1.0

: 2.0 : 1.0 : 2.0 e 1.1 : 2.0 : 1.0 : 2.0 respectivamente. Em sua análise, ambas enzimas não contêm Galactose e somente traços de Galactosamina.

De acordo com OTA et al. (1963), a bromelina do fruto também é uma glicoproteína, com 3,2% de carboidrato no fruto verde e 3,3% com o fruto maduro. Nesta análise, o autor não detectou a presença de Glicosamina.

Ota et al. (1985), separaram dois componentes principais do fruto do abacaxi, chamando-os de SBA e SBB. Destes, o SBA possui 8,2% de carboidrato por molécula de proteína, e a SBB 4,3%.

A pinguinaína, uma cisteíno-protease extraída da *Bromelia pinguin* L., segundo TORO-GOYCO et al. (1968), também é uma glicoproteína, contendo 1,7 a 1,9% de carboidrato do seu peso total.

Já a enzima fitolacaina G, uma outra cisteíno-protease, extraída dos frutos da planta *Phytolacca americana*, segundo UCHICOBÁ et al. (2000), não é uma glicoproteína, utilizando o método de detecção fenol-ác.sulfúrico.

De acordo com TAKAHASHI (1969), (*apud* COOREMAN, 1976) os resíduos de carboidratos não estão envolvidos diretamente no mecanismo catalítico da Bromelina do Talo.

As figuras dos alinhamentos dos resíduos de aminoácidos, mostram que todos eles possuem valores acima de 40% de identidade, o que confere às modelagens uma maior confiabilidade, pois a comunidade científica aceita modelagem para proteínas que tenham acima de 30% de identidade, e também porque os modelos utilizados tratam-se de enzimas da mesma família.

Pelas estruturas obtidas através da técnica de modelagem para as enzimas bromelina do talo e ananaina, podemos observar que ambas possuem dois domínios separados pelo sítio catalítico, semelhante à papaína, que teve a sua estrutura tridimensional determinada por difração de raios-X, (KAMPHUIS et al. 1984), e tem

seus domínios designados por L e R. No domínio L a papaína têm três α -hélices, dados semelhantes aos obtidos para a ananaina e para bromelina do talo. Já no domínio R, a papaína têm duas hélices, segundo KAMPHUIS et al. (1984), enquanto a ananaina e a bromelina do talo apenas uma.

A estrutura secundária do tipo folha- β , segundo KAMPHUIS et al. (1984) a maior parte esta no domínio R, igualmente obtido para a ananaina e para a bromelina do talo e fastuosaina.

Segundo KAMPHUIS et al. (1984), na papaína o domínio L (DI), é constituído pelos resíduos 10 a 11 e 208 a 212, já o domínio R (DII), do resíduo 1 ao 9 e 112 ao 207, assim a fastuosaina e a papaína possuem uma semelhança no que diz respeito ao número de resíduos que constituem o domínio DII.

Na fastuosaina o domínio DI, é composto basicamente pela estrutura secundária α -hélice, e no domínio DII, o predomínio é de folha- β do tipo anti-paralela. Na papaína o domínio L (DI), é composto por α -hélice, e o domínio R (DII) por folha- β do tipo anti-paralela, DRENTH et al. (1971). Na GP-II extraída da *Zingiber officinale*, CHOI et al. (1999) também é observada esta característica.

No domínio DI da fastuosaina, temos 3 α -hélices, que chamamos de α -HI, α -HII, α -HIII. Na α -HI, temos o resíduo de Cys-26, e esta é a maior das α -hélices constituída pelos resíduos 26 a 43.

Na papaína, esta mesma α -hélice é constituída pelos resíduos 24 ao 42, onde temos o resíduo da Cys-25, o qual corresponde à cisteína do sítio ativo, (KAMPHUIS et al. 1984).

A α -hélice α -HII da fastuosaina é composta pelos resíduos 51 a 57. Na papaína esta mesma α -hélice é composta pelos resíduos 50 a 57, (KAMPHUIS et al. 1984). Já a α -HIII, na fastuosaina, é composta pelos resíduos 67 a 78 e na papaína também, apresentando o mesmo número de resíduos nesta estrutura.

Já CHOI et al. (1999), quando realizaram a sobreposição dos C- α para calcular o *r.m.s.d* da enzima GP-II, extraída da *Zingiber officinale*, e obteve valores acima de 1,0Å, exceto para a actinidina que foi de 0,69Å. Nossos valores foram sempre abaixo de 1,0Å, exceto para pro-fastuosaina, isto pode ser devido ao número de átomos envolvidos.

Na enzima GP-II extraída da *Zingiber officinale*, CHOI et al. (1999), foram identificadas 3 ligações dissulfeto, entre as Cys-24 e 65; Cys-58 e 98; e Cys-155 e 206. Estes resíduos são provavelmente conservados por toda família da papaína, RAWLING e BARRETT, (1994). A presença destas 3 ligações dissulfeto nestas proteases ajuda na estabilização da molécula, dificultando a sua desnaturação.

Segundo ElMOUSSAOUI et al. (2001), todas as proteinases da *Papaya* são sintetizadas como pro-enzimas, como observado para a fastuosaina. Segundo o mesmo autor, as formas maduras geralmente contêm de 212 a 218 resíduos de aminoácidos, como obtido para a fastuosaina.

Segundo BAKER et al. (1996), para o correto enovelamento das cisteino-proteases, é necessário uma longa pro-região, que pode compreender até 30% do massa molecular da pro-enzima. Esta pro-região provavelmente apresenta duas funções, ajudar no enovelamento e inibidor, (BAKER et al., 1996).

Segundo COHEN et al. (1986), a observação de que a papaína é produzida como zimogênio é no sentido de evitar a digestão dentro da célula.

UCHIKOBA et al. (2000), através do seqüenciamento das enzimas fitolacaina G e R, observou também a inserção de um resíduo de Ser e Asn para a fitolacaina G e R, respectivamente, no N-Terminal em relação a papaína. Na fastuosaina observamos também a inserção no N-terminal de um resíduo de Ala, semelhante ao observado por RITONJA et al. (1989).

O resíduo de Pro na posição 2 (na posição 3 na fastuosaina), segundo RAWLING e BARRETT, (1994), é conservado na família da papaína e tem como função a prevenção da autólise do N-terminal.

6. CONCLUSÃO.

Durante o decorrer deste trabalho e com a finalização dos nossos resultados chegamos as seguintes conclusões:

A enzima fastuosaina é um monômero com massa molecular por volta de 25KDa, é uma enzima glicosilada, e pelos resultados de dicroísmo circular, pertence à classe de proteínas $\alpha+\beta$.

Pela caracterização realizada, a fastuosaina apresenta maior atividade em pH próximo do neutro, o que está de acordo com as proteases encontradas em outras fontes vegetais, tais como, as bromelinas extraídas do abacaxi, segundo ROWAN et al. (1994).

O NaCl mostrou efeito sobre a atividade catalítica das peptidases fastuosaina, bromelina do talo e do fruto e papaína. A elevação da força iônica mostrou um efeito ativador sobre a atividade catalítica da fastuosaina e da papaína, enquanto para a atividade catalítica das bromelinas do talo e do fruto, teve um efeito negativo, embora as maiores concentrações mostrem uma elevação, um efeito com o obtido para a Cruzaina segundo os dados de JÚDICE et al. (2001).

O efeito da uréia sobre a atividade catalítica das enzimas estudadas neste projeto, mostrou que a fastuosaina é mais resistente que a papaína na presença da uréia como agente desnaturante. A resistência da enzima já havia sido demonstrada em testes de inativação de nucleases na presença de uréia Cabral et al. (2000).

A atividade catalítica na presença de uréia mostrou que a bromelina do fruto é mais resistente, do que a fastuosaina e a bromelina do talo e a papaína; quando atingimos a concentração de 0,5M de uréia.

Quanto ao mapeamento dos subsítios, a fastuosaina apresentou alguma peculiaridade, como por exemplo Pro em P₁, fato este pouco observado entre a proteases.

A fastuosaina, tem baixa afinidade pelos resíduos r carregados negativamente Ácido Aspártico e Ácido Glutâmico.

Já a bromelina do talo apresentou uma especificidade pelos resíduos de Arginina, Tirosina e Histidina no subsítio S₁. Este subsítio também é pouco seletivo, pois aceita resíduos carregados positivamente (básicos), (Arg e His) e resíduos polares (Tyr). Segundo ROWAN et al. (1988), a bromelina do talo tem preferência pelo substrato Z-Arg-Arg-NH-Mec, ou seja, ela aceita Arg em P₁, corroborando com os nossos resultados.

Quanto à seqüência de aminoácidos a fastuosaina mostrou uma alta identidade com as bromelinas, o que faz muito sentido, dada sua origem.

De fato, a estrutura tridimensional obtida por modelagem molecular para a fastuosaina, mostrou que esta enzima pertence à família da papaína, possuindo também dois domínios, separados por uma fenda na qual se encontra o sítio catalítico, e também uma disposição semelhante das estruturas secundárias α -hélice e folha- β .

Pelos resultados obtidos quanto à determinação de carboidratos, a fastuosaina é uma glicoproteína, assim como a bromelinas. De acordo com OTA et al. (1963) e ISHIHARA et al. (1979) as bromelinas do fruto e do talo são glicoproteínas. No caso da última, ela possui os seguintes monossacarídeos: Manose, Fucose, Xilose e N-acetilglicosamina, sendo o oligossacarídeo ligado em um resíduo de Asparagina.

A fastuosaina clonada, mostrou uma atividade catalítica inferior a fastuosaina nativa, o que já era esperado, pois podem ocorrer a formação de corpos de inclusão, o que leva a enzima a precipitar, isto é devido a grande quantidade de enzima que é expressa.

A produção da fastuosaina clonada permitirá testar a enzima em várias

aplicações sem restrições de quantidades de material disponível, dificuldade esta que temos com a enzima nativa.

7. REFERÊNCIAS.

Analysis of Carbohydrates by High Performance Anion Exchange Chromatography with Pulsed Amperometric Detection (HPAE-PAD), Dionex Ficha Técnica nº20, Dionex, Sunnyvale CA, USA.

ASBÓTH, B.; et al. Cysteine proteases: the S₂ P₂ hydrogen bond is more important for catalysis than is the analogous S₁P₁ bond. *FEBS*, v. 233, n 2, p. 339-341, 1988.

ARROYO-REYNA, A.; et al. Circular dichroism of stem bromelain: a third spectral class within the family of cysteine proteinases. *Biochem. J.* v. 300, p. 107-110, 1994.

BAEZA, G.; et al. Proteolytic enzymes in *Carica candamarcensis*. *J. Sci. Food Agric.* v. 51, p. 1-9, 1990.

BAKER, K. C.; et al., Autocatalytic processing of pro-papaya proteinase IV is prevented by crowding of the active-site cleft. *Protein Engin.*, v. 9, n. 6, p. 525-529, 1996.

BARRETT, A. J. *Methods Enzymology*. Academic Press, 1994. v. 244, capítulo 32, p. 461-485.

BARRETT, A. J.; et al., *Handbook of proteolytic enzymes*. London: Academic Press, 1998 Cd-Rom.

BARRETT, A. J. I. Proteases. In: DALLING, M. J. *Plant Proteolytic Enzymes*. 1. ed. Florida, U.S.A. : CRC Press, Inc. Boca Raton, v. 1, capítulo 1, p. 1-16 1986 .

BERGER, A.; SCHECHTER, I. Mapping the active site of papain with the aid of peptide substrates and inhibitors. *Phios. Trans. R. Soc Lon B. Biol. Sci.* London., v. 257, p. 249-264. 1970.

BOLLER, T. Roles of Proteolytic Enzymes in Interaction of Plant with Other Organisms. In: MICHAEL, J.; DALLING, O., *Plant proteolytic enzymes* Boca Raton: CRC Press Inc, 1986 v.1 cap.4, p. 67-96.

BRADFORD, M. M. A Rapid and sensitive method for the quantitation of

microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.*, v. 72, p. 248-254, 1976.

BRÖMME, D.; et al. Production and activation of recombinant papain-like cysteine proteases. *Methods*, v. 32, p. 199-206, 2004.

BRUNO, M. A.; et al. Purification of a new endopeptidase isolated from fruits of *Bromelia hieronymi* Mez (Bromeliaceae). *Acta Farm. Bonaerense*, v. 21 nº 1, p. 51-56, 2002.

CABRAL, H.; et al. A plant proteinase, extracted from *Bromelia fastuosa* as alternative to proteinases K for DNA extraction. *Drosophila Information Service*, v. 83, p.178-185, 2000.

CABRAL, H. Isolamento e Caracterização Bioquímica de uma Cisteíno-Peptidase de Frutos de *Bromelia fastuosa* (Gravatá). 2001, Dissertação de Mestrado em Biofísica Molecular- Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas, Universidade Estadual Paulista, São José do Rio Preto, 2001.

CABRAL, H.; et al. Preliminary functional characterization, cloning and primary sequence of fastuosain, a cysteine peptidase isolated from fruits of *bromelia fastuosa*. *Protein P. Letters*, v.13, 2006, ***In Press***.

CARLSSON, S. R. Isolation and characterization of glycoproteins. In: FUKUDA, M.; KOBATA, A. *Glycobiology a practical approach.*, New York: Oxford University Press, 1993. p.1-26.

CERON, C. R.; et al. The use of gelatin dry cellophane wound slab gels in an embroidering hoop. *Rev. Brasil. Genet.* v. 15, 1, p. 201-203, 1992.

CHAGAS, J. R.; et al. Intramolecularly quenched fluorogenic tetrapeptide substrate for tissue and plasma kallikreins. *Anal Biochem.* v. 192, n 2, p. 419-425, 1991.

CHOI, K. H.; et al. The 2.1 Å structure of a cysteine protease with proline specificity from ginger rhizome, *Zingiber officinale*. *Biochem.*, v. 38, p. 11624-11633, 1999.

CHOMEZYNSKI, P. and SACCHI, N. *Anal. Biochem.* v.162, p. 156, 1987.

COHEN, L. W.; et al. Cloning and sequencing of papain-encoding cDNA. *Gene*,

v. 48, p. 219-227, 1986.

COOREMAN, W. M.; et al. Bromelian, biochemical and pharmacological properties. *Pharm. Acta Helv.*, v. 51, n 4, p. 73-97, 1976.

CORPET, F. *Nucl. Acids Res*, v. **16** n°22, p. 10881-10890, 1988.

COPELAND, R. A. *Methods for protein analysis: a practical guide to laboratory protocols*. New York: Chapman & Hall, 1994. 228 p.

CYGLER, M.; MORT, J. S., Proregion structure of members of the papain superfamily. Mode of inhibition of enzymatic activity. *Biochimie*, v 79, p. 645-652, 1997.

DAYHOFF, M. O., BARKER, W. C.; HUNT, L. T., Establishing homologies in protein sequences. *Methods Enzymol.* v. 91, p.524, 1983.

DE AZEVEDO Jr., W. F.; et al. *Biochem. and Biophys Research Commun.*, v. 293 n 1, p. 566-571 2002a.

DE AZEVEDO Jr., W. F.; et al. *Biochem. and Biophys. Research Commun.*, v. 295 n 1, p. 142-148 2002b.

DE AZEVEDO Jr., W. F.; et al. *Biochem. and Biophys. Research Commun.*, v. 297 n° 1, p. 1454-1458 2002c.

DeLANO scientific LLC, San Carlos California U.S.A., 2004.

DRENTH, J.; et al. *Advan. Protein Chem.* v. 25, p. 79-115, 1971.

DRENTH, J. Crystallizing a protein. In: *Principles of protein X-ray crystallography*. New York : Springer-Verlag, 1994. cap 1, p. 1-18.

DISTEFANO, S.; et al. Characterization of endoproteases from plant peroxisomes. *Biochem. J.*, v. 327S, p. 399-405, 1997.

DUBOIS, M.; et al. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Analyt. chemist.*, v. 28 n 3, p. 350-356, 1956.

- EL MOUSSAOUI, A.; et al. Revisiting the enzymes stored in the laticifers of *Carica papaya* in the context of their possible participation in the plant defence mechanism. *Cell. Mol. Life Sci.* v. 58, p. 556-570, 2001.
- FERSHT, A. Enzyme Structure and Mechanism. 2. ed. New York : W. H. Freeman and Company, 1995, 475p.
- GARCIA-CARREÑO, F. L.; DEL TORO, M. N. Classification of proteases without tears. *Biochem. Educ.*, v. 25 n 3, p. 161-167, 1997.
- GEHELHU, M.S.; et al. Use of a cysteine proteinase from *Carica candamarcensis* as a protective agent during DNA extraction. *Braz. J. of Med. and Biol. Res.*, v 31, n 9, p. 1129-1132, 1998.
- GROVES, M. R.; et al. The prosequence of procaricain forms an α -helical domain that prevents access to the substrate-binding cleft. *Structure*, 4, p. 1193-1203, 1996.
- GRZONKA, Z.; et al. Structural studies of cysteine proteases and inhibitors. *Acta Biochim. Pol.*, v.48 n 1 p. 1-20, 2001.
- HARRACH, T.; et al. Isolation and partial characterization of basic proteinases from stem bromelain. *J. of Protein Chem.*, v. 14, n 1, p.41-52, 1995.
- HEINICKE, R. M.; GORTNER, W. A. Stem bromelian a new protease preparation from pineapple plants. *Econ. Bot.* v. 11, p. 225-234, 1957.
- HIRATA, I.Y.; et al. Internally quenchend fluorogenic protease substrate : solid-phase synthesis and fluorescence spectroscopy of peptides containing ortho-aminobenzoyl/dinitrophenil groups as donor-acceptor. *Letters in Pept. Sci.* v 1, p. 299-308, 1995.
- HOOFT, R. W.; et al.. *Proteins*, v. 26, p. 363-376, 1996.
- ISHIHARA, H.; et al. Complete structure of the carbohydrate moiety of stem bromelian. *The J. of Biol. Chem.*, v. 254, p. 10715-10719, 1979.
- JUDICE, W. A. S.; et al. Comparison of the specificity, stability and individual rate constants with respective activation parameters for the peptidase activity of cruzipain and its recombinant form, cruzain, from *Trypanosoma cruzi*. *Eur. J.*

Biochem., v. 268, p. 6578-6586, 2001.

KAFEINAH, W.; et al. Human cathepsin K cleaves native type I and II collagens at the N-terminal end of the triple helix. *Biochem. J.* v. 331, p. 727-732, 1998.

KAMPHUIS, I. G.; et al. Structure of papain at 1,6Å resolution. *J. Mol. Biol.*, v. 179, p. 233-256, 1984.

KELLY, S. M.; NICHOLAS, PRICE C. The application of circular dichroism to studies of protein folding and unfolding. *Biochim. et Biophys Acta*, v. 1338, p. 161-185, 1997.

KENNETH, C. B.; et al. Autocatalytic processing of pro-papaya proteinase IV is prevented by crowding of the active-site cleft. *Protein Engin.*, v. 9 n 6 p. 525-529, 1996.

KUNDU, S.; et al. Structural characterization of a highly stable cysteine protease ervatamin C. *Biochem. and Biophys. Res. Commun.*, v. 264, p. 635-642, 1999.

KUNDU, S.; et al. Purification and characterization of a stable cysteine protease ervatamin B, with two disulfide bridges, from the latex of *Ervatamia coronaria*. *J. Agric. Food Chem.*, v. 48, p. 171-179, 2000.

LASKOWSKI, R. A.; et al. Procheck, v. 3.0- Program to check the stereochemistry quality of protein strutures- *Operating instructions*. 1994.

Leatherbarrow, R. J. *Grafit Version 3.0 Erithacus Software Ltd., Staines, UK*, 1992.

LEE, K. L.; et al. Complete amino acid sequence of ananain and a comparison with stem bromelian and other plant cysteine proteases. *Biochem. J.* v. 327, p. 199-202, 1997.

LEHNINGER, A. L.; NELSON, D. L.; COX, M. M. *Princípios de bioquímica*. 2.ed São Paulo: Sarvier, 1995 p. 839.

LOWE, G. The Cysteine Proteinases. *Tetrahedron*, v. 32, p. 291-302, 1976.

LÓPEZ, L. M. I.; et al. Purification and characterization of macrodontain I, a

cysteine peptidase from unripe fruits of *Pseudananas macrodontes* (Moor.) Harms (Bromeliaceae). *Protein Expr. and Purif.*, v. 18, p. 133-140, 2000.

MAHAJAN, A.; DUA, S. Improvement offunctional properties of rapeseed (*Brassica campestris* var toria) meal by reducing antinutritional factors employing enzymatic modification. *Food Hydrocoll.*, v. 12, p. 349-355, 1998.

MANAVALANE P.; CURTIS, W. JOHSON JR. Sensitivity of circular dichroism to protein tertiary structure class. *Nature*, v. 307 n. 27, p. 831-832, 1983

MAURER, H.R. Bromelain: biochemistry, pharmacology and medical use. *Cel. and Mol. Life Sci.*, v. 58 p. 1234-1245, 2001.

McGRATH, M. E. The lysosomal cysteine proteases. *Annu. Rev. Biopys. Biomol. Struct.*, v. 28, p. 181-204, 1999.

MELDAL, M.; et al. Inhibition of cruzipain visualized in a fluorescence quenched solid-phase inhibitor library assay D-amino acid inhibitors for cruzipain cathepsin B and cathepsin L. *J. Pept. Sci.* v 4 n 2, p. 83-91, 1998.

MÉNARD, R.; et al. The specificity of the S₁' subsite of cysteine proteases. *FEBS*, v. 328, n 1-2 p. 107-110, 1993.

MÉNARD, R. Structure-function studies in the papain family of cysteine proteases. *J. of the Braz. Assoc. for the Adv. of Sci.*, v. 45, n 5, p. 292-298, 1993.

MURACHI, T.; et al. Purification and characterization of a proteinase from pineapple fruit, fruit bromelain FA2. *J. Biochem.* V. 79, p. 1223-1234, 1976.

NICHOLLS, A.; et al. Proteins, Structure Function and Genetics, v. **11**, p. 281, 1991.

NAPPER, A. D.; et al. Purification and characterization of multiple forms of the pineapple-stem-derived cysteine proteinases ananain and comosain. *Biochem. J.*, v. 301, p.727-735, 1994.

OKOMOTO, T.; et al. Posttranslational removal of the carboxyl-terminal KDEL of the cysteine protease SH-EP occurs prior to maturation of the enzyme. *The J. of Biol. Chem.*, v. 274, n 16, p. 11390-11398, 1999.

- OTA, S.; et al. Preparation and chemical properties of purified stem and fruit bromelain. *Biochemistry*, v. 3, n 2, p.180-185, 1963.
- OTA, S.; et al. Reinvestigation of fractionation and some properties of the proteolytically active components of stem and fruit bromelain. *J. Biochem.*, v. 98, p. 219-228, 1985.
- PALMA, J. M.; et al. Plant proteases, protein degradation, and oxidative stress: role of peroxisomes. *Plant Physiol. Bioche.* v. 40, p. 521-530, 2002.
- PARDO, M. F.; et al. Purification of balansain I, an endopeptidase from unripe fruits of *Bromelia balansae* Mez (Bromeliaceae). *J. Agric. Food Chem.* v 48, p. 3795-3800, 2000.
- PORTARO, F. C. V.; et al. Probing the specificity of cysteine proteinases at subsites remote from the active site: analysis of P₄, P₃, P₂' and P₃' variations in extended substrates. *Biochem. J.*, v. 347, p. 123-129, 2000.
- PROTEIN Electrophoresis Application Guide. San Francisco: Hoefer scientific instruments, 1994.
- RAO, MALA B.; et al. Molecular and biotechnological aspects of microbial proteases. *Microbiol. and Mol. Biol. Rev.* p. 597-635, Sept., 1998.
- RAWLINGS, N. D.; BARRETT, A. J. *Methods Enzymology*. In: BARRETT, A. J. Families of cysteine peptidases, Academic Press, 1994. v. 244, cap. 32, p. 461-485.
- RITONJA, A.; et al. Stem bromelain: amino acid sequence and implications for weak binding of cystatin. *FEBS Letters*, v. 247 n 2, p. 419-424, 1989.
- ROMANELLI, P.F.; et al. Caracterização preliminar da enzima proteolítica do Gravatá (*Bromelia fastuosa*). *Bol. SBCTA*, v. 28, n 2, p. 120-133, 1994.
- ROWAN, A. D.; et al. Ananain: a novel cysteine proteinase found in pineapple stem. *Arch. of Biochem. and Biophys.* v. 267, n 1, p. 262-270, 1988.
- ROWAN, A. D.; et al. The cysteine proteinases of the pineapple plant. *Biochem. J.*, v. 266, p. 869-875, 1990.

- ROWAN, A. D.; BUTTLE, D. J. *Methods enzymology*. In: BARRETT, A. J. Pineapple cysteine endopeptidases. Academic Press, 1994. v. 244, cap. 38 p. 555-568
- SAMBROOK, J.; FRISTSCH E. F.; MANIATIS, T. *Molecular cloning: A laboratory manual*. Cold Spring Harbour Laboratory, N. Y., 2002.
- SALI, A. & BLUNDELL, T. L. J. *Mol. Biol.* v. 234, p. 779-815, 1993.
- SARATH, G.; et al. *Protease assay methods*. In: BEYNON, R. J., BOND, J. S. Proteolytic enzymes a practical approach.:New York Oxford University Press, 1996, cap. 3, p. 25-55.
- SEE, Y. S.; JACKOWSKI, G. Estimating molecular weights of polypeptides by SDS gel electrophoresis. In: CREIGHTON, T. E. *Protein struture a practical approach*. New York Oxford University, 1989 p. 1-19.
- SCHECTER, I.; BERGER, A. On the size of the active site in proteases. I. Papain. *Biochem. and Biophys. Res. Commun.*, v. 27, n 2, p. 157-162, 1967.
- SILVERSTEIN, R. M.; KEZDY, F. J. Characterization of the pineapple stem proteases (Bromelains). *Arch. of Biochem. and Biophys.*, v. 167, p. 678-686, 1975.
- STORER, A. C.; MÉNARD, R. *Methods enzymology*. In: BARRETT, A. J. Catalytic Mechanism in Papain Family of Cysteine Peptidases. *Academic Press*, 1994. v. 244. cap. 33 p. 486-500.
- STRYER, L. *Bioquímica*, 4ªed. Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, 1996 p.1000.
- TORO-GOYCO, E.; et al. Isolation, purification and partial characterization of pinguinain, the proteolytic enzyme from *Bromelia pinguin* L. *Arch. of Biochem. and Biophys.*, v. 126, p. 91-104, 1968.
- TURK, B.; et al. Lysosomal cysteine proteases: more than scavengers. *Biochim. et Biophys. Acta* v.1477, p. 98-111, 2000.
- UCHIKOBA, T.; et al. Melain G, a cysteine protease from green fruits of the bead tree, *Melia azedarach*: a protease affected by specific amino acids at P₃ position. *Biochim. et Biophys. Acta*, v. 1430, p. 84-94, 1999.

UCHIKOBA, T.; et al. Amino acid sequence and some properties of phytolacain G, a cysteine protease from growing fruit of pokeweed, *Phytolacca americana*. *Biochim. et Biophys. Acta*, v. 1523, p. 254-260, 2000.

VERNET, T.; et al. Secretion of functional papain precursor from insect cells. *The J. of Biol. Chem.*, v. 265, n 27, p. 16661-16666, 1990.

VOET, D.; VOET, J. G. Biochemistry 2^oed. New York: *Jonh Wiley & Sons*, 1995. 1360 p.

WIEDERANDERS, B., et al. Phylogenetic conservation of cysteine proteinases. *The J. of Biol. Chem.*, v. 267 n 19, p. 13708-13713, 1992.

WHITAKER, J. R. Principles of enzymology for food sciences. Marcel Dekker Inc., 1972.

8. ANEXO.

Anexo I

Perfil do cromatograma da eluição das enzimas, fastuosaina, bromelinas do fruto e do talo e da papaína, pela coluna de troca iônica SP-Sepharose.

Para garantirmos que a análises de carboidrato não era contaminação de carboidrato presente nas amostras, e sim ligadas nas enzimas, realizamos o método de fenol-sulfúrico e ensaio enzimático nos tubos coletados durante a cromatografia de troca iônica utilizando a resina SP-Sepharose.

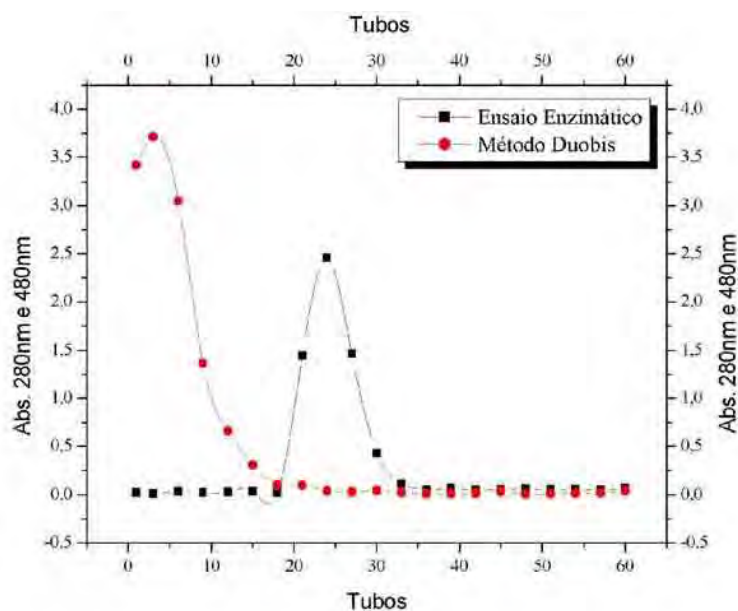


Figura 1-I. Perfil cromatográfico da Fastuosaina eluída com gradiente salino da resina SP-Sepharose. A atividade enzimática foi detectada através de ensaio enzimático, utilizando caseína 1% em tampão fosfato de sódio 100mM pH 7,0. O carboidrato foi detectado pelo método de Duobois, 1956.

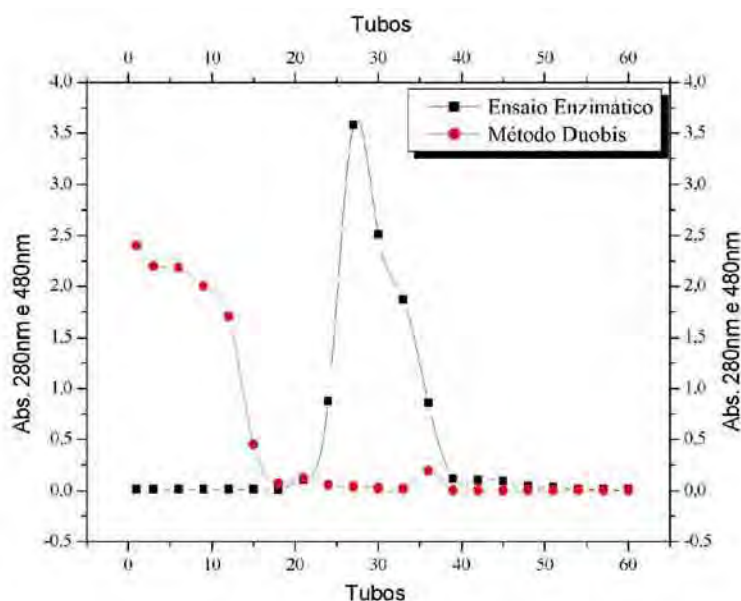


Figura 2-I. Perfil cromatográfico da Bromelina do Fruto eluída com gradiente salino da resina SP-Sepharose. A atividade enzimática foi detectada através de ensaio enzimático, utilizando caseína 1% em tampão fosfato de sódio 100mM pH 7,0. O carboidrato foi detectado pelo método de Duobois, 1956.

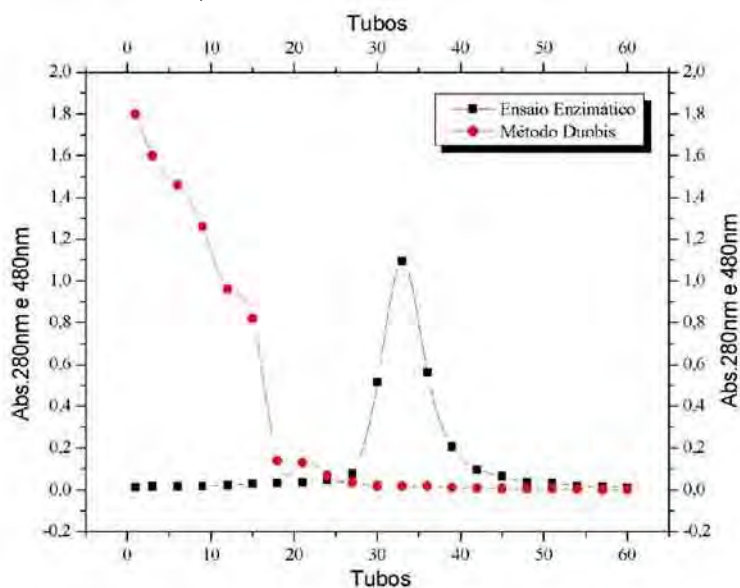


Figura 3-I. Perfil cromatográfico da Bromelina do Talo eluída com gradiente salino da resina SP-Sepharose. A atividade enzimática foi detectada através de ensaio enzimático, utilizando caseína 1% em tampão fosfato de sódio 100mM pH 7,0. O carboidrato foi detectado pelo método de Duobois, 1956.

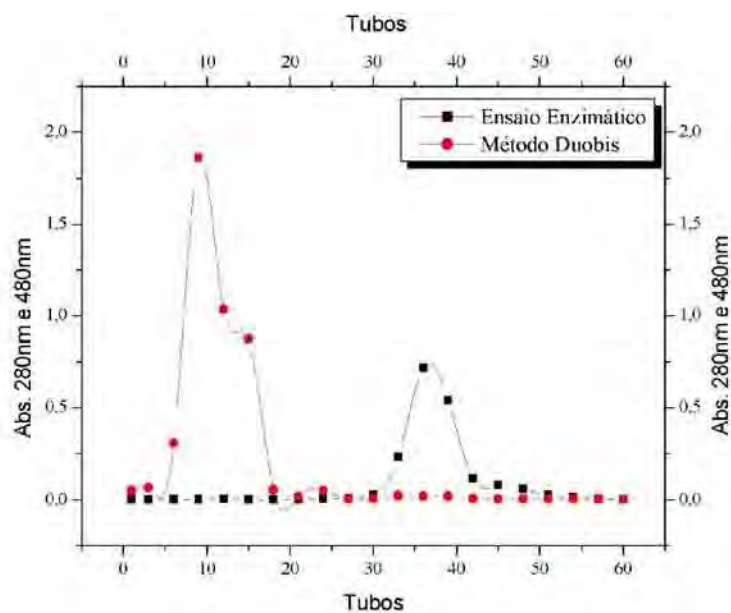


Figura 4-I. Perfil cromatográfico da Papaina eluída com gradiente salino da resina SP-Sepharose. A atividade enzimática foi detectada através de ensaio enzimático, utilizando caseína 1% em tampão fosfato de sódio 100mM pH 7,0. O carboidrato foi detectado pelo método de Duobois, 1956.