

UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESTADO DO RIO DE JANEIRO (UNIRIO)

STEPHANE LOURENÇO DA COSTA

DETECÇÃO, CARACTERIZAÇÃO E AVALIAÇÃO DA APLICAÇÃO
BIOTECNOLÓGICA DE PROTEASES EXTRAÍDAS DO LÁTEX DE *Euphorbia*
tirucalli

RIO DE JANEIRO

2021

STEPHANE LOURENÇO DA COSTA

DETECÇÃO, CARACTERIZAÇÃO E AVALIAÇÃO DA APLICAÇÃO
BIOTECNOLÓGICA DE PROTEASES EXTRAÍDAS DO LÁTEX DE *Euphorbia*
tirucalli

Monografia apresentada ao Instituto de Biociências da Universidade Federal do Estado do Rio de Janeiro como requisito para obtenção do grau de licenciatura em Biologia.

ORIENTADOR: Prof. César Luis Siqueira Junior

RIO DE JANEIRO

2021

Agradecimentos

Primeiramente agradeço a Deus que me deu força e sabedoria me mostrando que posso ser capaz de realizar coisas que estão além do meu alcance.

Agradeço ao professor orientador César Luis que durante 4 anos teve paciência e confiança. Também agradeço pelo acolhimento no grupo de pesquisa, orientação e conhecimento compartilhado, desenvolvendo em mim capacidades educacionais necessárias para me tornar uma boa pesquisadora, conduzindo-me a melhora de habilidades ainda não aprimoradas.

A minha irmã Jannine Lourenço por abrir meus olhos para novos caminhos, pelos conselhos e o incentivo a não desistir.

Ao meu amigo e companheiro Victor Hugo por sempre acreditar em mim, me apoiando e me ajudando nos momentos mais difíceis.

Aos meus colegas de laboratório Ana Carolina, Gustavo Bocayuva e Márcio Pereira que através dos seus ensinamentos, tornaram possível a conclusão deste trabalho.

Aos meus amigos Leandro Rocha, Lucas França e Francisco Santos por estarem ao meu lado animando meus dias e todo apoio.

Agradeço aos meus pais Jane Salles e Joselito do Carmo por me ensinarem a nunca desistir, mesmo que haja dificuldades, por me incentivarem a estudar, por me dar suporte e todo apoio durante a minha trajetória na universidade.

Agradeço também a todos os professores pelas aulas e trocas de informações. Em especial a professora Ana Cristina, por todo carinho, incentivo e dedicação durante as aulas ao compartilhar seus conhecimentos de forma simples e significativa agregando a na minha vida acadêmica.

E por fim, a coordenadora Maria Inês pela contribuição para a minha formação acadêmica e a todos os funcionários da Universidade Federal do Estado do Rio de Janeiro.

RESUMO

As proteases extraídas de plantas possuem inúmeras vantagens para a produção de muitos processos industriais por possuir condições de reações moderadas, alta especificidade de substrato e processamento ambientalmente amigável. As proteases extraídas de plantas possuem aplicabilidade na biotecnologia, especialmente para a produção de alimentos. Plantas da espécie *E. tirucalli* são conhecidas na medicina tradicional pelas suas propriedades medicinais pela sua eficácia em tratamentos de doenças, utilizando seu látex como remédio. Com isso, diversas pesquisas investigaram os efeitos dos seus compostos presentes no látex que demonstram eficácia para diversas aplicações biotecnológicas. Nesse trabalho, uma protease detectada no látex de *E. tirucalli* foi parcialmente purificada e caracterizada bioquimicamente, para fins biotecnológicos. A extração da tirucalina foi realizada através da extração do látex de *E. tirucalli* sendo incubado em água Milli-Q e centrifugado. O sobrenadante obtido após a centrifugação foi utilizado como extrato bruto rico em proteínas, que em seguida, foi submetido a saturação em sulfato de amônio resultando em uma fração concentrada contendo a protease. Através da elaboração de um ensaio enzimático, foi detectado uma atividade da protease do látex da planta, essa atividade foi então confirmada pela presença de uma banda proteica de massa molecular de 70 kDa, ao ser analisada via SDS-PAGE/Zimograma. A protease parcialmente purificada foi caracterizada bioquimicamente através de ensaios enzimáticos sob diferentes condições. Como resultado, observou-se que a protease desenvolve atividade pronunciada em altas temperaturas (90°C) e pH mais ácido (5,0). A atividade enzimática nas condições extremas de temperatura também foi avaliada, sugerindo uma estabilidade na atividade catalítica da enzima mesmo em condições extremas de temperatura e pressão, uma vez que mantém sua atividade mesmo após submissão a processo de autoclavação. A atividade da protease em um diferente substrato também foi avaliado, no entanto, a protease obteve a maior afinidade no substrato caseína ao apresentar maior atividade proteolítica. Essa afinidade foi observada também nos parâmetros cinéticos sobre o efeito da concentração do substrato caseína. Em adição, a avaliação da atividade milk clotting da tirucalina indicou uma possível aplicação na produção de queijo ao apresentar coagulação do leite. Proteases extraídas do látex de *E. tirucalli* apresentam potencial biotecnológico, com efeito coagulante, demonstrando também condições favoráveis para a indústria alimentícia na produção de queijo.

Palavras-chave: Protease, *Euphorbia tirucalli*, biotecnologia.

ABSTRACT

Proteases extracted from plants have advantages for the production of many industrial processes because they have moderate reaction conditions, high substrate specificity and environmentally friendly processing. Proteases extracted from plants have applicability in biotechnology, especially for food production. Plants of the species *E. tirucalli* are common in traditional medicine for their medicinal properties for their effectiveness in treating diseases, using their latex as a medicine. With that, several researches investigated the effects of its compounds present in the latex that demonstrate efficacy for diverse biotechnological applications. In this work, a protease detected in the latex of *E. tirucalli* was partially purified and characterized biochemically, for biotechnological purposes. The extraction of tirucalina was carried out through the extraction of latex from *E. tirucalli* being incubated in Milli-Q water and centrifuged. The supernatant after centrifugation was used as a crude extract rich in proteins, which was then subjected to saturation in ammonium sulfate defeated in a concentrated fraction containing a protease. Through the preparation of an enzymatic assay, a protease activity of the plant's latex was detected, this activity then confirmed by the presence of a protein band with a molecular mass of 70 kDa, when analyzed via SDS-PAGE/Zimogram. A partially purified protease was characterized biochemically through enzymatic assays under different conditions. As a result, it was observed that the high protease developed is pronounced at temperatures (90°C) and more acidic pH (5.0). The enzymatic activity in extreme temperature conditions was also evaluated, suggesting a stability in the catalytic activity of the enzyme even in extreme conditions of temperature and pressure, since it maintains its activity even after submission to an autoclaving process. The protease activity in a different substrate was also evaluated, however, a protease obtained the highest affinity in the casein substrate when presenting higher proteolytic activity. This affinity was also observed in the kinetic parameters on the effect of the casein substrate concentration. In addition, the evaluation of the milk clotting activity of tirucalina indicated a possible application in cheese production by presenting milk coagulation. Proteases extracted from the latex of *E. tirucalli* have biotechnological potential, with a coagulant effect, also demonstrating favorable conditions for the food industry in the production of cheese.

Keywords: Protease, *Euphorbia tirucalli*, biotechnology.

SUMÁRIO

RESUMO

ABSTRACT

1 INTRODUÇÃO	08
1.1 Proteases.....	08
1.2 Utilização de proteínas na produção de queijo.....	10
1.3 A planta aveloz (<i>Euphorbia tirucalli</i>).....	11
1.4 Látex vegetal.....	13
1.5 Aplicações da <i>Euphorbia tirucalli</i> na biotecnologia.....	14
2. OBJETIVO	16
2.1 Objetivo geral.....	16
2.2 Objetivo específico.....	16
3. MATERIAIS E MÉTODOS	16
3.1 Materiais.....	16
3.2 Extração de proteínas.....	16
3.3 Purificação parcial da protease do látex de <i>E. tirucalli</i>	17
3.4 Dosagem de proteínas.....	17
3.5 Análise das proteínas do látex de aveloz vi SDS-PAGE.....	17
3.6 Detecção de proteases vi SDS-PAGE/ZIMOGRANA.....	18
3.7 Avaliação da atividade proteolítica da protease contida no látex.....	18
3.8 Caracterização bioquímica da protease do látex de aveloz.....	19
3.8.1 Avaliação do efeito pH e da temperatura na atividade catalítica da protease.....	19
3.8.2 Avaliação da termoestabilidade da protease do látex de aveloz.....	19
3.8.3 Avaliação da estabilidade da protease em diferentes pHs.....	20

3.8.4 Avaliação da atividade cinética da protease.....	20
3.9 Avaliação da afinidade da protease por diferentes substratos.....	20
3.10 Avaliação da atividade milk clotting da protease	21
3.11 Análise estatística.....	21
4. RESULTADOS.....	21
4.1 Detecção de proteases via SDS-PAGE/Zimograma.....	21
4.2 Detecção da atividade proteolítica da protease do látex de aveloz.....	22
4.3 Caracterização bioquímica da protease do látex de aveloz.....	23
4.3.1 Efeito da variação de pH sobre a atividade proteolítica.....	23
4.3.2 Efeito da variação de temperatura sobre a atividade proteolítica.....	24
4.3.3 Avaliação da estabilidade da protease em diferentes pHs.....	24
4.3.4 Avaliação da estabilidade térmica da protease.....	25
4.4 Afinidade da protease por diferentes substratos.....	27
4.5 Análise dos parâmetros cinéticos.....	28
4.6 Análise da atividade milk clotting.....	29
5. DISCUSSÃO.....	30
6. CONCLUSÕES.....	33
7. REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA.....	34

1 INTRODUÇÃO

1.1 PROTEASES

As proteases são fisiologicamente necessárias para os organismos vivos e são encontradas em uma ampla diversidade de fontes, como plantas, animais e microorganismos. Os seres vivos possuem uma complexidade evolutiva que fornece uma enorme variedade de proteases devido a diversidade de ação, funções e estruturas (Jube e Borthackur, 2006; Rao et al, 1998). As proteases também são conhecidas como peptidases, enzimas proteolíticas e hidrolases de ligação peptídica. As enzimas proteolíticas catalisam reações metabólicas, e para que isso ocorra, a reação é acelerada pela enzima através de ligações de moléculas de substratos específicos. O substrato liga-se no sítio ativo da enzima que possui um arranjo característico de resíduos de aminoácidos definindo a interação enzima-substrato formando produtos (Jube e Borthackur, 2006).

As proteases representam uma das seis classes de enzimas, na subclasse 4 da classe 3 (hidrolases) e dividida com base na reação catalítica entre 13 subclasses (Jube e Borthackur, 2006). Dessa subclasse, há dois grupos que fazem divisão das proteases com base no local de ação, sendo elas as exopeptidases e endopeptidases. As exopeptidases clivam a ligação peptídica proximal aos terminais amino ou carboxi do substrato, enquanto as endopeptidases clivam ligações peptídicas distantes das extremidades do substrato. Proteases de serina, proteases aspárticas, proteases de cisteína e metaloproteases são os quatro grupos da subdivisão das endopeptidases que classificam as proteases com base no grupo funcional presente no sítio ativo da molécula (Tabela 1) (Rao et al, 1998).

TABELA 1. CLASSIFICAÇÃO DE PROTEASES. Os círculos abertos representam os resíduos de aminoácidos na cadeia polipeptídica. Os círculos sólidos indicam os aminoácidos terminais e as estrelas significam os terminais bloqueados. As setas mostram os locais de ação da enzima.

Protease	Modo de ação
Exopeptidases	
Aminopeptidases	• ↓ - ○ - ○ - ○ - ○ - ○ - -
Dipeptidil peptidase	• - • ↓ - ○ - ○ - ○ - ○ - -
Tripeptidil peptidase	• - • - • ↓ - ○ - ○ - ○ - -

Carboxipeptidase	--- o - o - o - o - o ↓ - •
Protease tipo serina	
Metaloprotease	
Protease tipo cisteína	
Peptidil dipeptidase	--- o - o - o - o ↓ - • - •
Dipeptidases	• ↓ - •
Ômega peptidases	* - • ↓ - o - o --- --- o - o - o ↓ - • - *
Endopeptidases	---- o - o - o ↓ - o - o - o ---
Serina protease	
Protease de cisteína	
Protease aspártica	
Metaloprotease	
Endopeptidases de mecanismo catalítico desconhecido	

Fonte: Rao et al, (1998).

As enzimas proteolíticas estão entre os três grandes grupos das enzimas industriais, originando interesses para aplicações fisiológicas e biotecnológicas representando 60% da venda total mundial de enzimas (Rao et al, 1998). As proteases possuem várias vantagens para o uso biotecnológico, possuindo condições de reações moderadas, alta especificidade de substrato e processamento ambientalmente amigável. Caracterizadas como enzimas industriais, elas têm sido amplamente utilizadas nas indústrias química, alimentícia, farmacêutica, agrícola e de combustíveis, principalmente para fins de fabricação (Rai, 2016).

Para selecionar uma protease industrial, alguns critérios são analisados, como condições ótimas de pH e temperatura, taxa de reação, estabilidade, efeito de inibidores e afinidade com substratos. Com isso, as proteases que possuem características que se enquadram a esses critérios, tornam-se eficazes na indústria de modo comercial na produção de alimentos, detergentes e nas aplicações nos campos fisiológicos (Rao et al, 1998; Sarrouh et al, 2012). Os rápidos avanços na tecnologia permitem o desenvolvimento de novos produtos exclusivos no mercado,

desenvolvendo enzimas farmacêuticas e de bioetanol para desenvolver outras enzimas específicas de aplicações (Sarrouh et al, 2012).

Proteases de plantas são matérias-primas para muitos processos industriais, as proteases mais conhecidas e utilizadas de origem vegetal são as papaínas, bromelinas, queratinases e as ficinas. As proteases vegetais são bem conhecidas por estarem envolvidas nos processos de defesa vegetal resistindo a diferentes tipos de condições desfavoráveis, incluindo o ataque de insetos e microrganismos fitopatogênicos. Mecanismos de proteção permite, na biotecnologia, a criação de plantas transgênicas com maior resistência a patógenos e microrganismos (Valueva e Mosolov, 2004). Proteases vegetais também desempenham outros papéis importantes nos processos intracelulares e extracelulares como desenvolvimento e amadurecimento de frutas, reserva nutricional, quebra de dormência de sementes, ativação e degradação de proteínas defeituosas (Ferreira et al, 2009). Atualmente, as proteases têm sido amplamente utilizadas na produção de detergentes, na indústria farmacêutica, em processos de biorremediação e principalmente na produção de alimentos, como preparação de hidrolisados de soja, amaciamento de carne, panificação e fabricação de queijos (Rao et al, 1998). Contudo, os vegetais necessitam de boas condições climáticas para o seu crescimento, com isso, torna-se um processo demorado para a produção de proteases (Rao et al, 1998).

1.2 UTILIZAÇÃO DE PROTEÍNAS NA PRODUÇÃO DE QUEIJO

Na indústria de laticínios, há utilização de proteases de origem animal e microbiana para a produção de queijos. A protease quimosina é utilizada como principal componente enzimático para a produção de coalho, essa protease é extraída do estômago de bezerro o que leva ao abate do animal. Devido à disponibilidade limitada e outros fatores, a busca de alternativas para a coagulação do leite levaram pesquisas a investigar enzimas coagulantes de origem vegetal. Enzimas de coagulação do leite extraídas das plantas estão presentes em quase todos os tipos de tecidos vegetais, sejam sementes, flores ou látex. Essas enzimas coagulantes do leite pertencem a proteases aspárticas, mas também em enzimas dos grupos das cisteínas e serina proteases (Shah, Mir e Paray, 2014). O uso de proteases extraídas

de plantas para a coagulação do leite, referente a produção de queijos na indústria de laticínios, torna-se eficaz pois o uso de coalho de origem animal são limitados por fins religiosos (judaísmo e islamismo), dieta (vegetarianismo) ou preocupação do consumidor com relação a alimentos geneticamente modificados (Raskovic, Lazic e Polovic, 2016).

1.3 A PLANTA AVELOZ (*Euphorbia tirucalli*)

Euphorbia tirucalli é uma planta suculenta nativa da África com muitas ramificações. Possui galhos finos, frágeis, suculentos, ricos em látex e pequenas folhas (Figura 1). Suas folhas são simples, carnudas, com lâmina linear e aguda na ponta. Espécies de *Euphorbia* são ricas em látex considerados tóxicos. A espécie *E. tirucalli* conhecida popularmente como aveloz possui distribuição geográfica ampla crescendo em climas tropicais semiáridos, florestas secas e úmidas. A planta aveloz, desenvolve-se de forma eficaz em climas quentes aumentando a sua biomassa de forma rápida, por esse motivo, é encontrada em matas secas, vegetação do tipo savana por ser submetida a altas intensidades de luz do sol. Suporta condições de estresse salino e baixas temperaturas chegando a tolerar a -2°C . Mas para o seu crescimento é necessário que haja temperaturas acima de 7°C e água regularmente (Loke, Mesa e Franken, 2011).

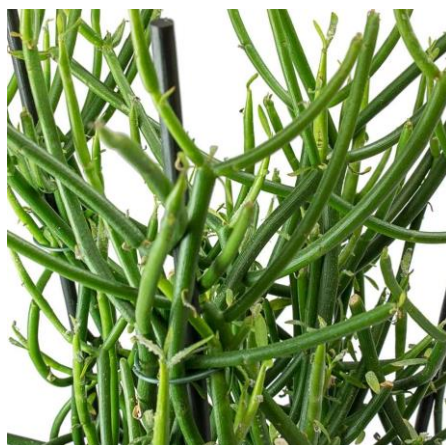


Figura 1- Planta *Euphorbia tirucalli*. Fonte: Hortology (2021)¹

¹ Disponível em: <https://hortology.co.uk/products/euphorbia-tirucalli-pencil-cactus-succulent>. Acesso em: 06 maio 2021.

A planta aveloz é popularmente conhecida pelas suas propriedades medicinais por sua eficácia em tratamentos de doenças, como por exemplo, a cura do câncer. Por possuir princípios ativos como hidrocarbonetos terpênicos, aldeídos e óleos essenciais, feiras livres e farmácias na região Norte e Nordeste do Brasil produzem e comercializam uma bebida chamada “garrafada” (Figura 2) a partir de extratos da planta de *E. tirucalli* e de outras plantas assegurando a cura para diversas doenças (Silva Pequeno, Caseiro e Souza, 2017).



Figura 2- Garrafada de *Euphorbia tirucalli*. Fonte: Página no facebook (2021)²

A espécie *E. tirucalli* possui altos níveis de esteróides, antocianinas, alcalóides, taninos, flavonóides e fenóis, que são base para a sua forte atividade antimicrobiana, que impulsiona a diversos estudos da espécie (Aloo, Oluko e Wanjohi, 2019). Extratos de diferentes partes da planta de *E. tirucalli* possuem a mesma quantidade de fitoconstituintes, exceto os flavonóides e esteróides. Os Flavonóides alteram a permeabilidade de membranas celulares inibindo o crescimento bacteriano devido à sua capacidade de formar complexos com a parede celular. Os esteróides possuem propriedades antibacterianas causando vazamentos de membrana e os taninos podem inibir bactérias inativando a adesão microbiana, funções das enzimas e proteínas do envelope celular (Aloo, Oluko e Wanjohi, 2019). O eupol (álcool tetracíclico triterpeno) é um composto isolado da planta, que possui efeitos anticâncer, inibindo o crescimento de células cancerígenas gástricas humanas e o desenvolvimento de tumores. Além disso, o eupol presente em plantas *E. tirucalli* possui um grande potencial anti-inflamatório, apresentando inibição a resposta

² Disponível em: <https://www.facebook.com/pg/Aranto-Panta-Que-CURA-o-C%C3%A2ncer-com-Sucesso-1630716810308197/photos/>. Acesso em: 06 maio 2021.

inflamatória induzida por TPA (12-O-tetradecanoilphorbol-13-acetato) em doenças de pele quando utilizado em pesquisas (Franco-Salla et al, 2016).

1.4 LÁTEX VEGETAL

Como foi abordado anteriormente (item 1.3), na região Norte e Nordeste do Brasil, é produzida uma bebida chamada garrafada consumida pela população por conter propriedades medicinais (Silva Pequeno, Caseiro e Souza, 2017). Na medicina tradicional, o látex vegetal da aveloz é largamente conhecido como remédio popular sendo utilizado contra a atividade reumática e neoplásicas e no tratamento de infecções bacterianas, fúngicas e virais (Silva Pequeno, Caseiro e Souza, 2017). Ele também é empregado no tratamento contra verrugas, distúrbios gastrointestinais, epilepsia, impotência sexual, asma, feridas, dor de dente, hemorroida, tumor, câncer (Palit et al, 2018).

O látex produzido em plantas de *E. tirucalli* é constituído por água, hidrossolúveis, triterpeno, taraxasterol, tirucalol, resina, goma euphorbium e borracha (Crowder e Sexton, 1964). O uso do látex da planta como remédio popular para tratamento de doenças é inadequado pois é considerado tóxico (Costa, 2012), contendo produtos químicos cáusticos e irritantes no látex, que causam reações na pele, membranas mucosas e olhos (Loke, Mesa e Franken, 2011). Na pele, esse látex pode causar pequenas queimaduras químicas, causando bolhas ou úlceras na pele e nas mucosas e grave inflamação (Loke, Mesa e Franken, 2011).

O látex vegetal da *E. tirucalli* é muito utilizado na medicina tradicional por diversos países como Brasil, Índia, Indonésia, Malabar e Malásia (Duke, 1983). Sabe-se que o uso do látex na forma diluída, como seiva pura ou em pequenas quantidades para tratamentos de doenças na medicina tradicional, traz diversos efeitos colaterais como queimação, irritação da boca, garganta, náusea, vômito, diarreia, hemorragias e cólicas e úlceras, acompanhadas de dor e possível diarreia (Loke, Mesa e Franken, 2011). Porém por possuir notoriedade local, pesquisas foram aprofundadas para obter resultados das suas possíveis propriedades medicinais. Os dados obtidos têm sido positivos, e com isso, suas propriedades são consideradas eficazes para o uso medicinal no combate de doenças, principalmente geradas pelo vírus HIV (Silva Pequeno, Caseiro e Souza, 2017).

1.5 APLICAÇÕES DA *Euphorbia tirucalli* NA BIOTECNOLOGIA

A *E. tirucalli* tem sido utilizada para diversas pesquisas, devido aos seus compostos que possuem atividades biológicas antiviral, anticâncer, antibacteriana, anti-inflamatória, antimutagênico, antitumoral e larvicida (Franco-Salla et al, 2016). Com isso, a investigação sobre os efeitos de *E. tirucalli* abrangeu resultados positivos em pesquisas focadas em áreas médicas, alimentares e ambientais.

O extrato bruto da planta de *E. tirucalli*, também vem sendo descrito em pesquisas com enfoque na agricultura pois a planta possui compostos que são capazes de combater patógenos fúngicos (*Fusarium oxysporum*) e bacterianos (*Erwinia chrysanthem* e *Ralstonia solanacearum*) que levam a doença da murcha de fusarium sendo observada em locais de cultivo de tomate (*Solanum lycopersicum L.*). O uso do extrato bruto de *E. tirucalli* em pesquisas *in vitro* de tecidos e rizosferas de tomate doentes se tornou eficaz ao inibir 30 mm dos patógenos em comparação ao o uso de outro extratos de plantas como *Opuntia monacantha* e *Ageratum conyzoides* que tiveram uma inibição entre 8,7 e 12,3 mm (Aloo, Oluko e Wanjohi, 2019). Adotar o uso de plantas como pesticidas naturais em práticas agrícolas, torna-se uma abordagem sustentável pois não são tóxicos, sendo também facilmente degradável. A necessidade de abordagens sustentáveis é devido ao uso de pesticidas sintéticos químicos para o controle de patógenos causadores da murcha que muitas vezes leva à poluição ambiental e à resistência a pragas (Aloo, Oluko e Wanjohi, 2019).

Na biotecnologia alimentar, o uso de proteases hidrolisadas são grandes aliadas para o processamento de alimentos. A hidrólise de proteínas no processamento de alimentos possui efeitos positivos, que incluem digestibilidade aprimorada, modificações na qualidade sensorial (como textura ou sabor), melhoria da capacidade antioxidante ou redução de compostos alergênicos (Tavano, 2013). Além disso, proteínas hidrolisadas possuem outras utilizações como processo de limpeza e estudos proteômicos (Tavano, 2013).

Pesquisas sugerem possíveis aplicações para fins terapêuticos em preparações dermatológicas, em análise fitoquímica e atividade fotoprotetora de extrato etanólico, a *E. tirucalli* apresenta um potencial de fotoproteção da radiação ultravioleta resultando variações de FPS de 6,05 a 19,84 do extrato etanólico da planta de aveloz. Concentrações do extrato de aveloz (0,01 a 0,1 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ p/v) possuem

potencial de fotoproteção da radiação ultravioleta podendo ser utilizadas, como protetores solares, pois o fator mínimo de proteção, é de FPS 06 e o fator máximo, protege a pele, 20 vezes mais do que não utilizando o extrato (Orlanda e Vale, 2015).

Através do uso da aveloz na medicina tradicional na região nordestina, pesquisas realizadas com o foco no combate a neoplasias, analisaram uma substância capaz de reagir contra o vírus HIV. Essa substância é chamada de ingenol, presente na planta de *E. tirucalli* que em contato com as células CD4+, ele reativa o vírus HIV liberando para a circulação sanguínea e expondo o vírus aos antirretrovirais existentes no corpo. Com isso, o vírus é inativado resultando em uma possível cura da Aids. Testes realizados *in vivo* em macacos Rhesus, foram bem sucedidos considerando posteriormente testes em humanos realizados nos Estados Unidos e na Europa (Silva Pequeno, Caseiro e Souza, 2017).

Partículas para o encapsulamento de fármacos são produzidas à base de poliéster (ácido polilático-co-glicólico) contendo o látex da planta *E. tirucalli*, que diminui os efeitos colaterais pois superam os mecanismos de resistência celular e aumentam a seletividade da droga no sítio-específico por apresentar elevada eficiência de encapsulamento (>70 %) (Rodrigues, 2017). A *E. tirucalli* atuando no encapsulamento, produz uma libertação controlada e constante do fármaco durante 6 horas diminuindo a toxicidade nos órgãos saudáveis do organismo possibilitando um maior tempo de permanência do fármaco na circulação (Rodrigues, 2017; João, 2013).

A *E. tirucalli* produz entre 200 e 500 megatoneladas de biomassa fresca por hectare por ano (22 - 55 MT de matéria seca) possuindo condições ideais para a produção de biocombustíveis. O látex, açúcares e a celulose da aveloz podem ser convertidos em biogás através da digestão anaeróbica. A produção estimada é de 275 m³ de biogás (60% de metano) por tonelada seca da planta. Em uma produção de 30 MT/ha/ano, isso resulta em 8.250 m³ biogás. O combustível de transporte pode ser produzido através do látex que contém hidrocarboneto, em grande parte um triterpenóide C₃₀ que produz a gasolina de alta octanagem. *E. tirucalli* também pode ser convertida em açúcares por pré-tratamento e hidrólise produzindo etanol (Loke, Mesa e Franken, 2011).

As plantas de *E. tirucalli* possuem compostos proteicos no seu látex, que caracterizados, podem representar o potencial uso biotecnológico nas indústrias

alimentícias e farmacêuticas. Análises bioquímica de uma protease presente no látex de aveloz, demonstram condições favoráveis para o uso dessa proteína em bioprocessos na indústria alimentícia para a produção de gêneros alimentícios como o queijo. Dessa forma, o presente trabalho visa detectar e caracterizar a atividade proteolítica desta protease, bem como a aplicação biotecnológica.

2 OBJETIVO

2.1 Objetivo geral

Detectar e caracterizar bioquimicamente uma protease extraída a partir do látex de *E. tirucalli*, avaliando sua aplicação para fins biotecnológicos.

2.2 Objetivos específicos

- Detectar a atividade catalítica da protease contida do látex de aveloz;
- Purificar parcialmente a protease contida no látex de aveloz;
- Caracterizar bioquimicamente a proteases do látex de aveloz;
- Avaliar a cinética enzimática da protease;
- Evidenciar o potencial biotecnológico da protease na indústria alimentícia.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 MATERIAIS

O Látex utilizado como fonte de proteínas foi extraído de plantas da espécie de *Euphorbia tirucalli*. O látex foi coletado a partir do caule de plantas localizadas nas cidades de Campos dos Goytacazes e São João da Barra / RJ ao longo dos anos de 2017 a 2020. Uma exsicata da planta foi preparada e disponibilizada no Prof. Jorge Pedro Pereira Carauta – HUNI com o número de voucher (HUNI 5769).

3.2 EXTRAÇÃO DE PROTEÍNAS

As proteínas do látex de *E. tirucalli* foram extraídas incubando-se o látex coletado em água Milli-Q (1:1), sob vigorosa agitação. Em seguida, a mistura foi centrifugada a 13000 rpm (rotações por minuto) por 1h a 4°C. Após a centrifugação,

o sedimento foi descartado e o sobrenadante, foi utilizado como extrato bruto rico em proteínas (EB).

3.3 PURIFICAÇÃO PARCIAL DA PROTEASE DO LÁTEX DE *E. tirucalli*

O EB foi submetido a precipitação em sulfato de amônio a 0-30% de saturação sob agitação vigorosa por 1h a 4°C. Logo após, a mistura foi centrifugada a 13000 rpm por 1h a 4°C. O sedimento foi descartado e o sobrenadante, novamente submetido a precipitação em sulfato de amônio a 30-60% de saturação por 1h a 4°C. Por final, a mistura foi centrifugada a 13000 rpm por 1h a 4°C, o pellet resultou em uma fração (F60) concentrada contendo uma protease parcialmente purificada na qual denominamos tirucalina.

3.4 DOSAGEM DE PROTEÍNAS

A obtenção da concentração de proteínas totais das amostras EB e F60 foi dada através da metodologia descrita por Bradford (1976). A proteína BSA (Albumina Soro Bovina, do inglês, *Bovine Serum Albumin*) foi utilizada para a produção de uma curva padrão nas concentrações finais: 2 µg, 4 µg, 6 µg, 8 µg e 10 µg individualmente adicionadas ao reagente Bradford. As misturas foram analisadas em espectrofotômetro (biospectro SP-220) em cubeta de vidro, com leitura a 595 nm.

3.5 ANÁLISE DAS PROTEÍNAS DO LÁTEX DE AVELOZ VIA SDS-PAGE

As amostras EB e F60 foram analisadas em gel de poliacrilamida 10% pela técnica de SDS-PAGE, seguindo o método descrito por Laemmli (1970). As proteases provenientes no EB e F60, foram adicionadas (40 µg) ao tampão de amostra 4X (tris-HCl 125 mmol/l, pH 6,8, SDS 2%, azul de bromofenol 0,05%, glicerol 20%) na presença de β-mercaptoetanol 5%, marcador de massa molecular contendo as proteínas padrão fosforilase B (94 kDa), soroalbumina (67 kDa), ovoalbumina (43 kDa), anidrase carbônica (30 kDa), inibidor de tripsina (20,1 kDa) lisozima (14,4 kDa) e aprotinina (6,5 kDa), foram submetidos à eletroforese sob uma voltagem constante de 140V no tampão de corrida 1X (3% Tris, 1% SDS e 14,2% glicina) em temperatura ambiente. Em seguida, o gel foi corado utilizando-se solução corante (40% metanol, 10% ácido acético e 0,1 % coomassie blue) sob agitação por 40 min e descorado com

solução descorante (5% metanol e 7% ácido acético) até o aparecimento das bandas no gel de poliacrilamida.

3.6 DETECÇÃO DE PROTEASES VIA SDS-PAGE/ZIMOGRAMA

Para detectar a presença de proteases no EB e na fração F60, um gel de poliacrilamida foi realizado, as amostras foram fracionadas em gel de poliacrilamida 10% contendo gelatina 10% seguindo uma modificação da técnica de SDS-PAGE descrita por Egito et al (2007). Após a corrida eletroforética em uma voltagem constante de 140V, o gel foi lavado duas vezes durante 30 minutos em solução 2,5% de Triton X-100, para a remoção do SDS. A detecção da atividade proteolítica sobre a gelatina foi então iniciada incubando-se o gel em tampão citrato fosfato 50 mM pH 5, a 37°C durante 2 horas. Após esse período o gel foi lavado com água destilada, e submetido a coloração com a solução coomassie blue (40% metanol, 10% ácido acético e 0,1 % coomassie) sob agitação e descorado com solução descorante (5% metanol e 7% ácido acético); até o aparecimento das bandas translúcidas.

3.7 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE PROTEOLÍTICA DA PROTEASE CONTIDA NO LÁTEX

Para caracterizar a atividade proteolítica da protease presente no látex de aveloz, utilizou-se caseína como substrato nos ensaios. O EB foi submetido a ensaios enzimáticos baseados na metodologia descrita por Vallés, Furtado e Cantera (2007). A amostra foi analisada em triplicatas de ensaios enzimáticos em tubos de microcentrífuga contendo em cada tubo 40 µg de proteínas. As amostras, foram incubadas, individualmente, em tampão 50 mM fosfato de sódio pH 6 contendo caseína 1%, em um volume final de 350 µl, por 20 minutos à 37°C. A reação foi interrompida pela adição de 1 ml de TCA 5% (ácido tricloroacético). A mistura foi centrifugada a 3000 rpm por 15 minutos a temperatura ambiente. O sobrenadante resultante da centrifugação foi medido no espectrofotômetro em uma absorbância de 280 nm para detectar a concentração da proteína na amostra. O resultado foi expresso em UAP/mg (Unidade de Atividade Proteolítica), onde cada UAP refere-se ao aumento de 0,01 na absorbância da amostra comparado ao controle negativo (tubo 0) nos quais a amostra foi adicionada a tubos após a adição de ácido tricloroacético. A unidade mg,

refere-se a conversão da concentração de proteínas de micrograma para miligrama expresso por 0,04.

3.8 CARACTERIZAÇÃO BIOQUÍMICA DA PROTEASE DO LÁTEX DE AVELOZ

3.8.1 Avaliação do efeito do pH e da temperatura na atividade catalítica da protease

Com a finalidade de avaliar a atividade proteolítica da protease parcialmente purificada do látex de *E. tirucalli* sobre o efeito de pH, foi empregado uma variação da metodologia descrita no item 3.7, substituindo o tampão de ensaio 50 mM fosfato de sódio pH6 pelos respectivos tampões 50 mM citrato fosfato (pH 4 e 5); fosfato de sódio (pH 6, 7 e 8) e tris-HCl (pH 9, 10 e 11).

Da mesma forma, a avaliação da temperatura ideal para uma máxima atividade proteolítica foi feita através da variação da metodologia descrita anteriormente no item 3.7. A atividade proteolítica foi avaliada incubando-se a amostra F60, adicionada a tampão 50 mM citrato fosfato pH 5 em diferentes temperaturas (25, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 a 100 °C).

3.8.2 Avaliação da termoestabilidade da protease do látex de aveloz

Para avaliar a estabilidade térmica da tirucalina sob diferentes condições de temperatura, a fração F60 foi pré-incubada em diferentes temperaturas de 25, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 a 100 °C respectivamente, durante uma hora, em seguida, congeladas. Após 24 horas do período de incubação, as amostras foram submetidas ao ensaio enzimático seguindo a metodologia descrita no item 3.7 nas condições ideais de atividade da protease, ou seja, à 90°C, pH 5.

Para a avaliação da atividade bioquímica da amostra F60 em condições extremas, a amostra foi submetida a pré-incubação a 100°C durante 10, 30, 60, 90 e 120 minutos, em seguida congelada. Além disso, uma alíquota de F60 foi submetida a autoclavação por 30 min a 125°C e 1 atm de pressão. Após o tratamento a amostra também foi congelada. Após o tratamento, a amostra pré-incubada à 100 e 125°C foram congeladas por 24 horas e, por final, aplicadas em ensaios enzimáticos na

metodologia descrita no item 3.7 nas suas condições ótimas e realizada as análises estatísticas.

3.8.3 Avaliação da estabilidade da protease em diferentes pHs

Para avaliar a estabilidade da protease parcialmente purificada em diferentes pHs, a amostra F60 foi submetida a pré-incubação por uma hora nas diferentes faixas de pH usando os tampões 50 mM citrato fosfato (pH 4 e 5); fosfato de sódio (pH 6, 7 e 8) e tris-HCl (pH 9, 10 e 11) e em seguida congeladas. O ensaio enzimático foi realizado após 24 horas do período de incubação seguindo a mesma metodologia descrita no item 3.7 nas condições ideais de atividade da protease, ou seja, à 90°C.

3.8.4 Avaliação da atividade cinética da protease

Para a obtenção dos parâmetros cinéticos da protease parcialmente purificada, análises da atividade proteolítica da fração F60 sobre diferentes concentrações do substrato (2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18 e 20 mg/mL), foram realizadas. Os resultados dos parâmetros cinéticos foram provenientes de ensaios enzimáticos elaborados conforme o método 3.8 descrito por Vallés, Furtado e Cantera (2007), adaptado utilizando as condições ótimas da protease, ou seja, à 90°C, pH 5. Em seguida, através do método de regressão não linear Enzifitter (Leatherbarrow, 1999), estabelecida a partir do programa computacional do software excel foram determinadas a constante de Michaelis-Menten (K_m) e a velocidade máxima de reação ($V_{m\acute{a}x}$).

3.9 AVALIAÇÃO DA AFINIDADE DA PROTEASE POR DIFERENTES SUBSTRATOS

A avaliação da afinidade da protease do látex de aveloz por diferentes substratos, foi realizada através do uso dos substratos BSA (Bovine serum albumin) e caseína. A amostra F60 foi incubada com os substratos BSA e caseína em ensaios enzimáticos nas suas condições ótimas de pH no tampão citrato fosfato 50 mM e temperatura à 90°C, com base na metodologia descrita no item 3.7 conforme descrito por Vallés, Furtado e Cantera (2007).

3.10 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE MILK CLOTTING DA PROTEASE

Para fins biotecnológicos, a atividade coaguladora do leite (do inglês *milk clotting activity*) foi avaliada utilizando a fração F60 de acordo com método de Egito et al (2007). O substrato foi elaborado a partir de solução aquosa de leite em pó desnatado 10% contendo 0,01 mol de cloreto de cálcio (pH 6,5), da qual 2 ml foram submetidos a pré-incubação por 10 min a 37°C. Em seguida, o ensaio foi iniciado com a adição de 200 µl da amostra F60 e incubação a 90 °C. Após o aparecimento dos primeiros coágulos de leite (coalho) a contagem de tempo foi interrompida e o tempo entre a adição da amostra e o aparecimento do coalho de leite, foi calculado. A nível de cálculo da atividade, uma unidade milk clotting (UMC) do leite é definida como a quantidade de enzima presente em 1 ml de extrato enzimático necessária para coagular 10 ml de substrato em 40 minutos, seguindo a fórmula:

$$\text{UMC (U/ml)} = 2400 / \text{tempo de coagulação (segundos)} \times \text{volume do substrato (ml)} / \text{quantidade de enzima (em ml)}.$$

3.11 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados foram analisados por ANOVA (fator único) usando o software Excel 365. O nível de significância estatística foi estabelecido em $P < 0,05$.

4 RESULTADOS

4.1 DETECÇÃO DE PROTEASES VIA SDS-PAGE/ZIMOGRAMA

A eletroforese permitiu a observação da migração das proteínas extraídas do látex da *E. tirucalli* (Figura 3). A análise SDS-PAGE/Zimograma sugere a presença de uma protease de aproximadamente 70 kDa, demonstrando atividade catalítica da protease pela clivagem da gelatina contida no gel apresentado bandas claras nas raias que contém o EB e a amostra parcialmente purificada na fração F60, indicando também, uma atividade proteolítica da mesma.

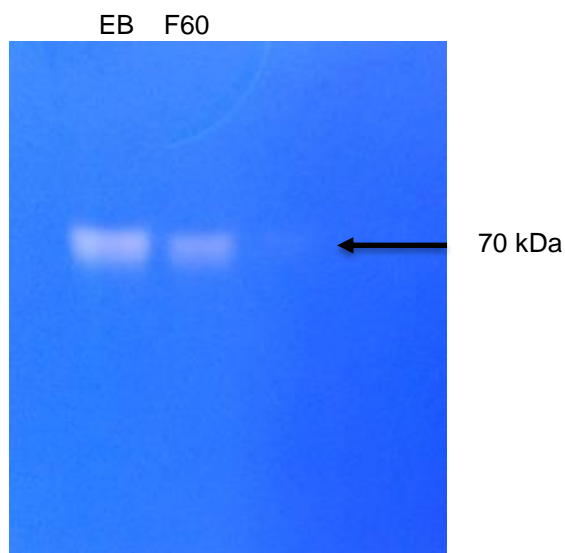


Figura 3- Detecção de proteases no látex de *E. tirucalli* via SDS-PAGE/Zimograma: EB- extrato proteico bruto com 40µg de proteínas totais em condições semi-desnaturantes; F60- fração contendo protease com 40µg de proteínas totais em condições semi-desnaturantes. Fonte: Elaborado pelo autor (2021).

4.2 DETECÇÃO DA ATIVIDADE PROTEOLÍTICA DA PROTEASE DO LÁTEX DE AVELOZ

Para reforçar a ideia da presença da uma protease no látex de aveloz, o extrato bruto e a fração F60 foram incubadas com o substrato caseína em ensaios enzimáticos. Na Figura 4, pode-se observar o aumento da absorbância indicando a clivagem de caseína durante o ensaio. A amostra EB apresenta uma atividade proteolítica de 1085 UAP/mg, enquanto no tampão de extração (na ausência de proteínas do látex de aveloz) não se obtém uma atividade.

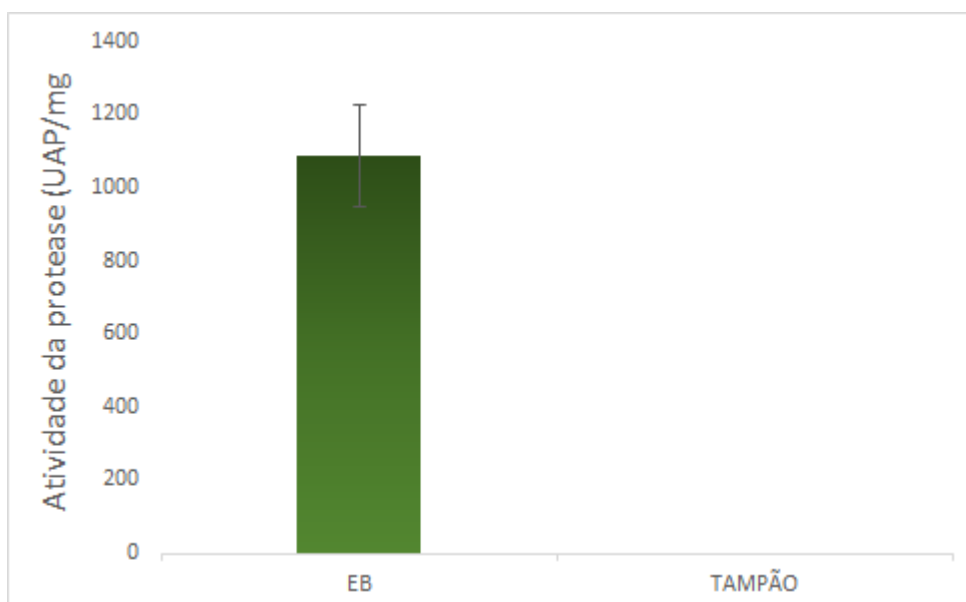


Figura 4- Detecção da atividade proteolítica de proteases do látex de aveloz. Cada barra representa a média de três experimentos independentes: EB – Extrato bruto rico em proteínas (40µg/µL) incubado com caseína em tampão fosfato de sódio pH 6. TAMPÃO – tampão fosfato de sódio pH 6 (na ausência de látex) incubado com caseína. O desvio padrão de três réplicas experimentais estão representadas pela barra. Fonte: Elaborado pelo autor (2021).

4.3 CARACTERIZAÇÃO BIOQUÍMICA DA PROTEASE DO LÁTEX DE AVELOZ

4.3.1 Efeito da variação de pH sobre a atividade proteolítica

A determinação do pH ótimo da protease presente na amostra F60 foi obtido através de ensaios enzimáticos em diferentes pHs. A atividade proteolítica da amostra F60, apresentou atividade pronunciada em todos os pHs testados nas faixas de 4 a 11, possuindo atividade acima de 70%. Contudo, em pH 5 a protease apresentou a maior atividade enzimática, indicando que a atividade ótima da protease de aveloz ocorre nessa faixa de pH, sendo assim, representado como 100% de atividade (Figura 5).

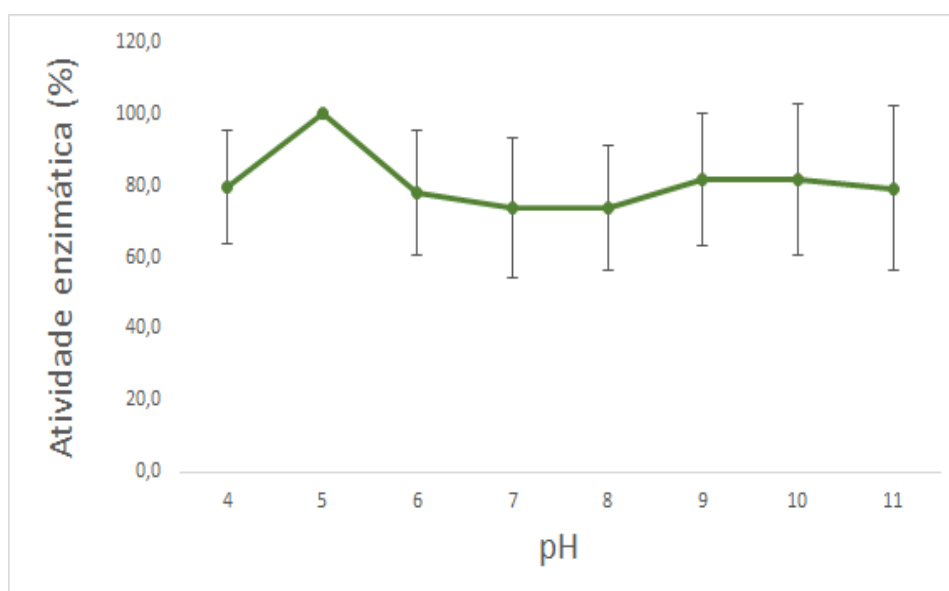


Figura 5- Efeito da variação de pH sobre a atividade proteolítica da protease de aveloz. Os pontos representam a atividade proteolítica de 40µg da fração F60 incubada a 37°C, alterando-se o pH de acordo com os tampões usados: Citrato Fosfato (pH 4 e 5); Fosfato de Sódio (pH 6, 7 e 8) e Tris-HCl (pH 9, 10 e 11). As amostras foram incubadas utilizando-se caseína, como substrato. O desvio padrão de três réplicas experimentais estão representadas pelas barras em cada ponto. Fonte: Elaborado pelo autor (2021).

4.3.2 Efeito da variação de temperatura sobre a atividade proteolítica

Com o intuito de definir o efeito da variação de temperatura sobre a atividade catalítica da protease extraída do látex da planta de aveloz, a amostra F60 foi avaliada nas temperaturas entre 25 à 100°C em ensaios enzimáticos (Figura 6). A temperatura ótima da protease foi estabelecida sendo igual a 90°C, por possuir a maior atividade enzimática, sendo assim, considerado como o 100% de atividade, razão pela qual foi escolhida como a temperatura ideal para os demais ensaios enzimáticos para a análise bioquímica da protease. Pode-se observar que a fração F60 apresenta uma atividade proeminente também a 50°C, na qual atinge a atividade de 80% sendo apenas 20% menor que a atividade obtida na temperatura ideal de ensaio.

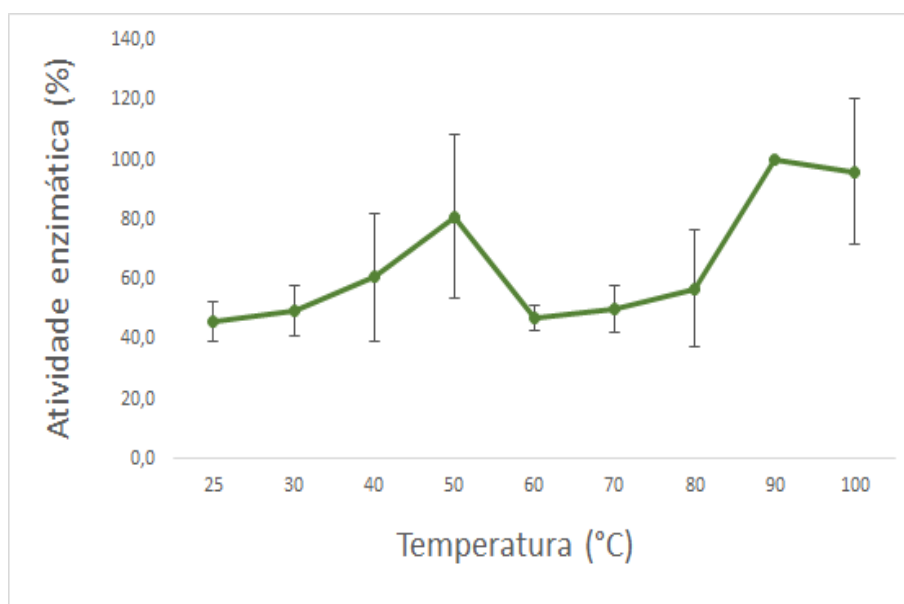


Figura 6- Efeito da variação de temperatura sobre a atividade proteolítica da protease de aveloz. Cada ponto representa a atividade proteolítica de 40µg da fração F60 incubada em Tampão Citrato Fosfato pH 5, à diferentes temperaturas 25°, 30°, 40°, 50°, 60°, 70°, 80°, 90° e 100°C. As amostras foram incubadas utilizando-se caseína, como substrato. O desvio padrão de três réplicas experimentais estão representadas pelas barras em cada ponto. Fonte: Elaborado pelo autor (2021).

4.3.3 Avaliação da estabilidade da protease em diferentes pHs

Para avaliar a estabilidade da protease de aveloz, a fração F60 foi submetida a pré-tratamento em diferentes pHs por uma hora e congeladas por vinte e quatro horas antes de sua utilização no ensaio enzimático (Figura 7). Pode ser

observado que atividade proteolítica da tirucalina mantém atividade acima de 90% em todos os pHs testados, mas com um leve declínio de atividade em pHs mais alcalinos.

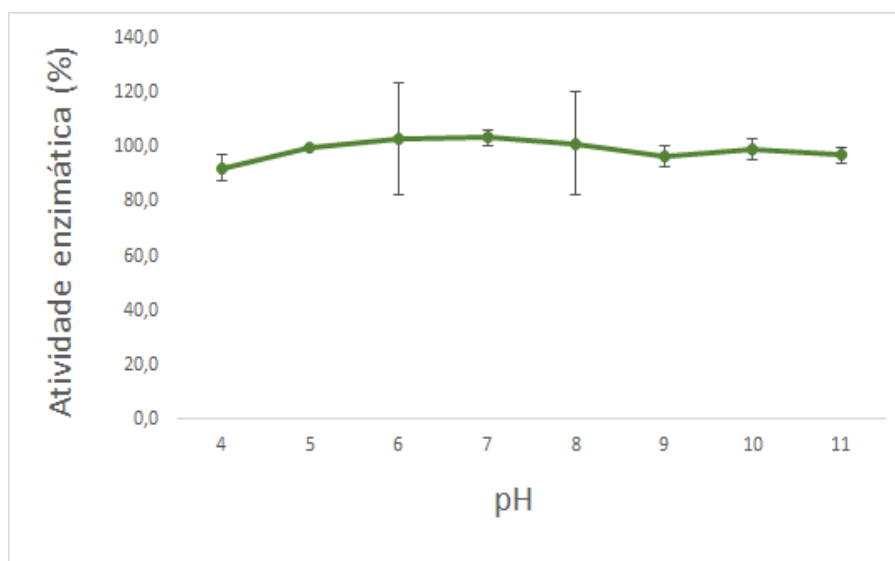


Figura 7- Avaliação da estabilidade proteolítica da protease de aveloz em tratamento de pH. Cada ponto representa a atividade da protease pré-incubada à diferentes pHs em tampões Citrato Fosfato (pH 4 e 5); Fosfato de Sódio (pH 6, 7 e 8) e Tris-HCl (pH 9, 10 e 11) utilizando F60 (40µg/µL). Após os tratamentos, a amostra foi incubada à 90°C em pH 5,0 utilizando-se caseína como substrato. O desvio padrão de três réplicas experimentais estão representadas pelas barras em cada ponto. Fonte: Elaborado pelo autor (2021).

4.3.4 Avaliação da estabilidade térmica da protease

Submetida a ensaios de termoestabilidade nas temperaturas de 25 a 100°C, a protease se manteve estável em todas as faixas de temperatura (Figura 8). Com base nos resultados obtidos através da avaliação da estabilidade de temperatura, é possível observar que a protease se mantém ativa mesmo após tratamento em diversas temperaturas, até mesmo após a fervura (100°C). Quando submetida à fervura por diferentes períodos, a protease tem sua atividade proteolítica levemente reduzida em 10% (Figura 9). Com base nas análises realizadas em ensaios com a amostra pré-incubada a 100°C, ensaios enzimáticos foram realizados com a protease autoclavada a 120°C sob pressão de 1 atm (Figura 10). A tirucalina autoclavada, possui ainda 77% da atividade proteolítica.

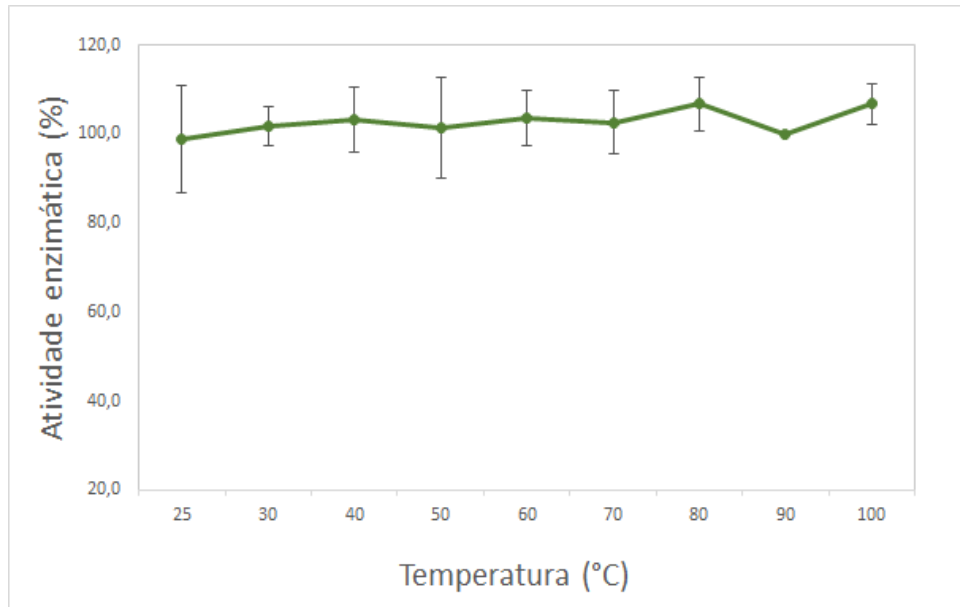


Figura 8- Avaliação da estabilidade proteolítica da protease de aveloz em tratamento de temperatura. Cada ponto representa a atividade da protease pré-incubada à diferentes temperaturas utilizando F60 (40 μ g/ μ L). Após os tratamentos, a amostra foi incubada a 90°C em pH 5,0 utilizando-se caseína como substrato. O desvio padrão de três réplicas experimentais estão representadas pelas barras em cada ponto. Fonte: Elaborado pelo autor (2021).

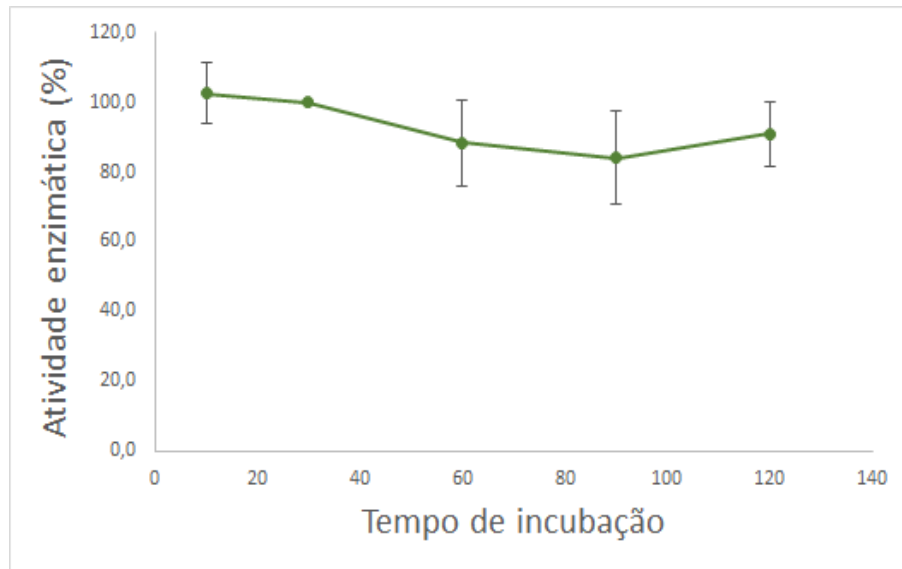


Figura 9- Avaliação da estabilidade proteolítica da protease de aveloz em tratamento de temperatura 100°C. Cada ponto representa a atividade da protease pré-incubada à diferentes tempos (10, 30, 60, 90, 120 min) utilizando F60 (40 μ g/ μ L). Após os tratamentos, a amostra foi incubada a 90°C em pH 5,0 utilizando-se caseína como substrato. O desvio padrão de três réplicas experimentais estão representadas pelas barras em cada ponto. Fonte: Elaborado pelo autor (2021).

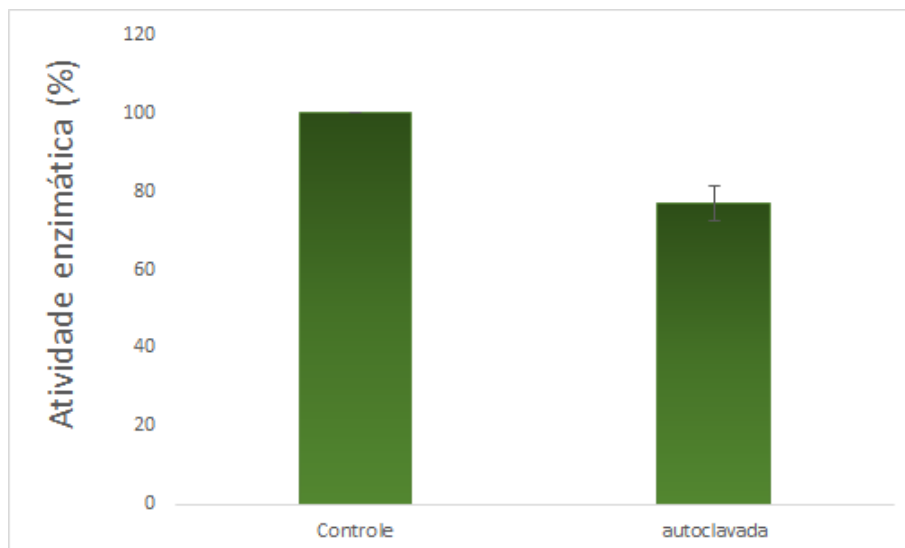


Figura 10- Avaliação da atividade proteolítica da protease de aveloz em tratamento de autoclavagem. Barra 1- Amostra controle quimiopapaína (20 µg) incubada com caseína em tampão fosfato de sódio pH 6. Barra 2- F60 – Fração precipitada em sulfato de amônio (40µg/µL) autoclavada por 30 min a 125°C. Após a autoclavagem, a amostra foi incubada a 90°C em pH 5,0 utilizando-se caseína como substrato. O desvio padrão de três réplicas experimentais estão representadas na barra em que a amostra foi autoclavada. Fonte: Elaborado pelo autor (2021).

4.4 AFINIDADE DA PROTEASE POR DIFERENTES SUBSTRATOS

Para avaliar a presença de atividade na amostra F60 do látex de aveloz em um diferente substrato, utilizou-se BSA como um segundo substrato de comparação com a caseína. A amostra F60 incubada com o substrato BSA, apresentou uma atividade em média de 507 UP/mg. No entanto, na presença do substrato caseína, a protease apresentou uma maior afinidade, indicando uma clivagem com atividade de 976 UP/mg sobre o substrato (Figura 11).

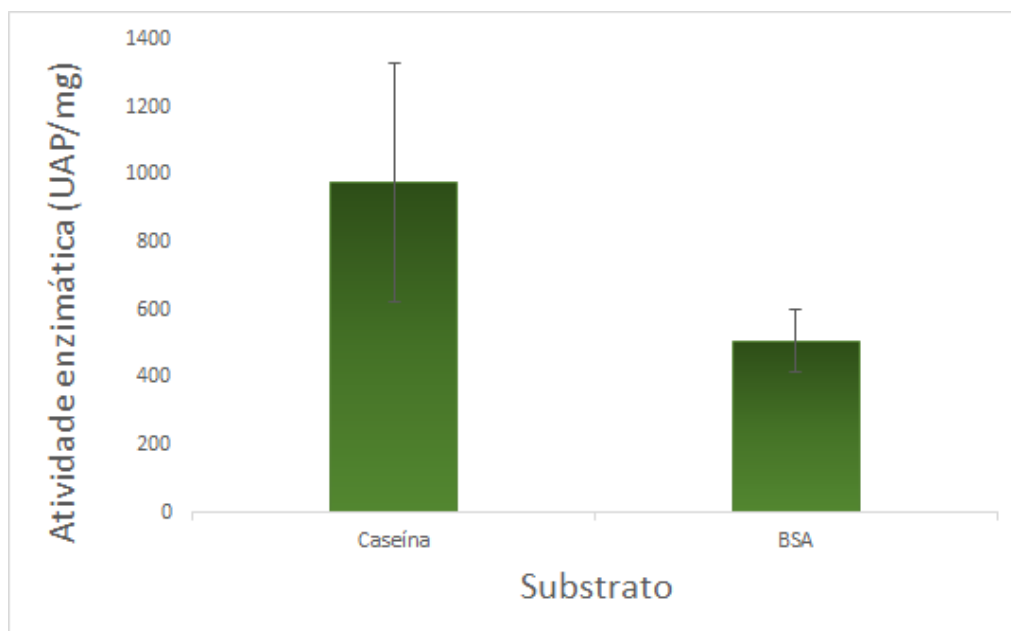


Figura 11- Análise comparativa dos substratos caseína e BSA. Cada barra representa um tratamento: Caseína - amostra F60 incubada no tampão citrato fosfato de sódio pH 5 com caseína como substrato. BSA- amostra F60 incubada no tampão citrato fosfato de sódio pH 5 com BSA como substrato. O desvio padrão de três réplicas experimentais estão representadas na barra em que a amostra foi incubada com o substrato BSA. Fonte: Elaborado pelo autor (2021).

4.5 ANÁLISE DOS PARÂMETROS CINÉTICOS

A avaliação dos parâmetros cinéticos sobre o efeito da concentração do substrato em diferentes intervalos de 2 a 20 mg/mL, foi analisado nos parâmetros de K_m e $V_{máx}$ através da cinética de Michaelis-Menten. A interação entre a protease e o substrato caseína, apresentou os seguintes valores: K_m : 4,39 mM e $V_{máx}$ 2,48 min/nmol. Esses valores representam a afinidade da protease sobre o substrato caseína demonstrado na Figura 12, no qual a constante de Michaelis-Menten (K_m) foi demonstrado através do gráfico do duplo recíproco de lineweaver-Burk ($1/v_x 1/[S]$).

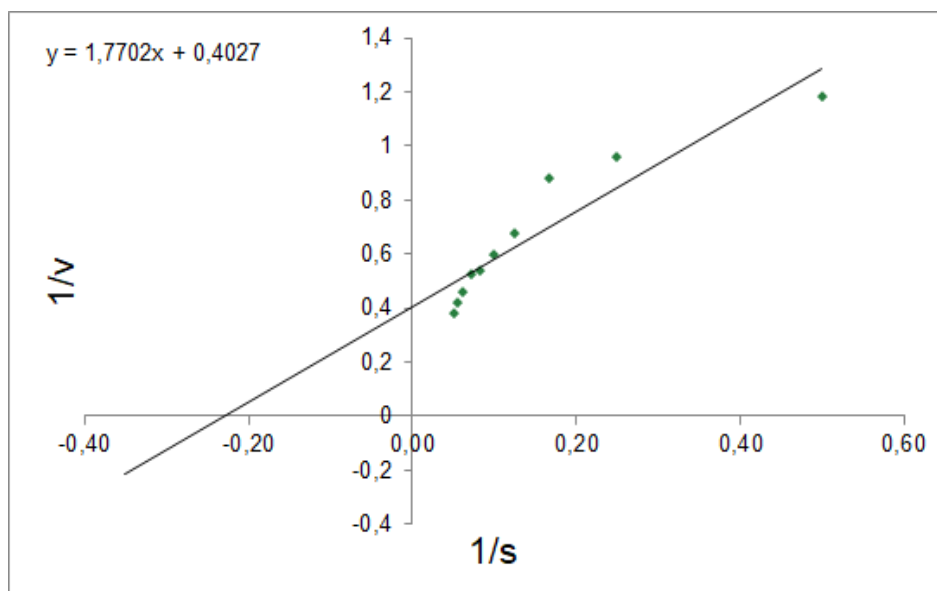


Figura 12- Curva de lineweaver-Burk. A velocidade de reação para as diferentes concentrações do substrato caseína. A linha reta na figura representa o ajuste linear dos pontos experimentais. Fonte: Elaborado pelo autor (2021).

4.6 ANÁLISE DA ATIVIDADE MILK CLOTTING

A análise da atividade milk clotting, foi obtida através da visualização de coágulos ao ser incubada a amostra F60 sobre o substrato e tampão cloreto de cálcio. A formação de coágulos no leite desnatado contendo tampão cloreto de cálcio (CaCl_2) e a amostra F60, resultou em uma análise qualitativa da atividade coagulante do leite. Na Figura 13, observou-se que o tubo contendo somente tampão cloreto de cálcio e leite em pó desnatado (tubo do canto esquerdo), não apresentou coágulos, quando comparado ao tubo no qual a amostra F60 foi adicionada (tubo do canto direito), no qual o coalho formado pela atividade da protease é bem visível após 5 minutos de reação. A mesma atividade coagulante também foi observada no controle experimental (tubo do centro), no qual a atividade de quimosina promove a formação desse coalho após 13 minutos de incubação. Como forma de expressar essa atividade coagulante de leite, os tempos de reação e formação de coalho foram utilizados para o cálculo de UMC, como mostrado na figura 14. Pode ser observado que a amostra F60 atinge 80 UMC, quando comparado ao controle negativo (na ausência de proteínas do látex) no qual não se observa reação.



Figura 13- Análise qualitativa da atividade coagulante de leite (milk clotting) da protease do látex de aveloz sobre leite desnatado. Tubo A- 10% de leite em pó desnatado contendo 10 mM de CaCl_2 na ausência da fração F60. Tubo B- 10% de leite em pó desnatado contendo 10 mM de CaCl_2 incubado com quimosina. Tubo C- 10% de leite em pó desnatado contendo 10 mM de CaCl_2 incubado com a fração F60. Fonte: Elaborado pelo autor (2021).

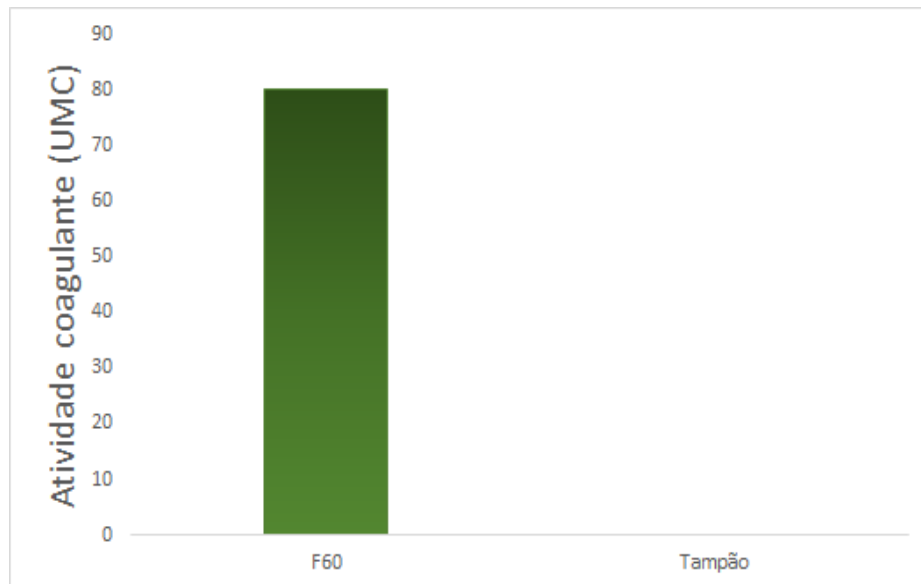


Figura 14- Determinação da atividade coagulante de leite (milk clotting). Barra 1- Amostra F60 (200 μl) incubada 10% de leite em pó desnatado contendo 10 mM de CaCl_2 pH6. Barra 2- 10% de leite em pó desnatado contendo 10 mM de CaCl_2 pH6. Fonte: Elaborado pelo autor (2021).

5 DISCUSSÃO

Compostos extraídos de *Euphorbia tirucalli* são amplamente estudados para possíveis aplicações medicinais. No entanto, pouco se sabe sobre a composição proteica da planta. Neste trabalho, uma protease extraída do látex de *E. tirucalli* foi parcialmente purificada e submetida a caracterização bioquímica e a avaliação do

potencial biotecnológico para aplicação na bioindústria. Em meio a outras proteínas extraídas do látex de aveloz, detectou-se uma protease de peso molecular de ~70 kDa capaz de clivar a gelatina presente no gel SDS-PAGE.

Em contrapartida, a mesma amostra, F60 contendo a banda proteica capaz de clivar a gelatina, também apresenta atividade proteolítica sobre a caseína, reforçando a ideia de que a proteína de ~70kDa seja uma protease. Pesquisas com plantas da família Euphorbiaceae relatam enzimas cujas espécies *Euphorbia nivulia* e *Euphorbia mauritanica* L. apresentam proteases pertencentes a famílias cisteíno e serino proteases chamadas nivulian-II e mauritanicain provenientes do látex, possuindo condições favoráveis a aplicações industriais para a produção de laticínios (Badgujar e Mahajan, 2014; Flemming et al., 2017). A tirucalina extraída do látex de *E. tirucalli* apresentou atividade proteolítica máxima em pH 5. Outros autores também descreveram que plantas pertencentes à família *Euphorbiaceae* demonstraram atividade ótima em pH mais ácidos, como por exemplo protease de *Cnidocolus urens* em pH 5,0 e *Ricinus communis* L. com pH próximo de 6,0 (Menezes, 2013; Maciel, 2007). A identificação do pH ideal para a atividade proteolítica de uma protease contribui para a classificação da mesma. Dentre as classes de proteases conhecidas, as serino proteases são conhecidas por possuírem uma faixa de reação ótima em pHs mais alcalinos, enquanto a classe das cisteíno proteases são mais ativas em pHs mais ácidos com atividade de reação ótima em pH próximo ou igual a 5 (Rao et al., 1998). Desse modo, propõe-se que a protease parcialmente purificada do látex de aveloz seja pertencente a classe das cisteíno protease devido a atividade ótima em pH mais ácido. Estudos sobre a classe da enzima detectada e parcialmente purificada serão realizados posteriormente. Estudos demonstram que proteases ativas em pHs mais ácidos possuem diversas aplicações industriais, como a produção de queijos, que requer um pH ácido (Rao et al., 1998).

Com base na atividade enzimática sob o efeito de temperatura, a atividade ótima de temperatura da tirucalina foi obtida à 90°C. A protease parcialmente purificada manteve sua atividade estável em todas as temperaturas testadas, mesmo nas condições extremas de temperatura, como por exemplo a fervura (100 °C) por períodos prolongados de tempo, a protease não reduz a sua atividade significativamente. Além disso, processos térmicos utilizados para a desnaturação

proteica, como a autoclavação a 120° e 1 atm, não afetaram significativamente a atividade proteolítica da protease, demonstrando a termoestabilidade da enzima. Os resultados apresentados por Monteiro júnior (2017) são semelhantes, não apresentando redução da atividade da cistatina de *Vigna unguiculata*, quando avaliado a estabilidade térmica a 100°C por diferentes períodos de tempo crescentes. Proteases que possuem atividade em altas temperaturas, possuem o potencial para aplicações industriais, podendo ser utilizadas em várias áreas como alimentícia, farmacêutica e agrícola.

Além de termoestabilidade avaliada, a protease do látex de aveloz também apresentou estabilidade em diferentes pHs, mantendo a atividade catalítica após tratamento meio ácido ou meio básico. A estabilidade de proteases em relação ao pH, estão presentes em diversas famílias de plantas, como por exemplo uma protease cisteínica estável denominada proceraína do látex da planta medicinal *Calotropis procera* e uma protease cisteínica do látex de *Ervatamia coronaria* chamada ervatamina B (Dubey e Jagannadham, 2003; Kundu, Sundd e Jagannadham, 2000). Proteases que possuem estabilidade ampla em diferentes pHs e temperaturas, obtém vantagens para diversas aplicações industriais na produção de detergentes na indústria química e de alimentos como laticínios na indústria alimentícia (Rao et al., 1998). Aparentemente, as proteínas produzidas pela espécie *E. tirucalli* apresentam alta estabilidade a um amplo espectro de temperaturas e pHs. Milhm (2017) demonstrou a termoestabilidade de um inibidor de protease cisteínica purificado extraído do caule de aveloz. Neste trabalho foi demonstrado que o inibidor, chamado de tirustatina, apresenta forte estabilidade inclusive no processo de autoclavação. Esses dados, reforçam a ideia de que a protease parcialmente purificada no presente trabalho pode ser empregada em processos biotecnológicos graças às suas características bioquímicas.

A atividade proteolítica de uma protease depende da interação enzima-substrato, no presente trabalho, foi evidenciado uma maior interação com a caseína no sítio ativo da protease ao comparar com substrato BSA. A facilidade da protease em se ligar ao substrato caseína, ocorre devido a presença de prolina, que interrompe cadeias de alfa-hélice e beta gerando poucas estruturas secundárias, terciárias e ausência de pontes de dissulfeto. A caseína também apresenta uma estrutura aberta

devido ao alto teor de prolina, que a torna facilmente acessível para a clivagem proteolítica (Elzoghby, Abo El-Fotoh e Elgindy, 2011). A análise cinética realizada pela equação de Michaelis-Menten da tirucalina em relação ao substrato caseína, indicam que as concentrações crescentes do substrato resultou na saturação da protease atingindo o valor máximo de 2,48 min/nmol. O valor de k_m equivalente a 4,39 mM demonstrou uma afinidade da protease parcialmente purificada com o substrato caseína.

Com o aumento mundial de consumo de queijo e a redução no fornecimento de coalho, impulsionou a procura de outras fontes coagulantes extraídas de plantas. Diversas pesquisas relataram enzimas capazes de coagular o leite em tais plantas como *Cucumis melo* (melão), *Actinidia Deliciosa* (kiwi) *Zingiber officinale* (gengibre) e *Moringa oleífera* (moringa), essas enzimas podem estar presentes em: raízes, folhas, caules, frutas, flores e algumas secreções de plantas (por exemplo, látex) (Moreno-Hernández et al., 2019). A coagulação do leite ocorre através de modificações físico-químicas nas micelas de caseína, ao inserir a enzima coagulante no leite a camada externa da caseína (fração κ -caseína) ocorre a hidrólise da caseína realizada por endopeptidases que hidrolisa a ligação peptídica entre a fenilalanina (105) e a Metionina (106) da cadeia peptídica da κ -caseína, eliminando a capacidade estabilizante e gerando como produtos uma porção hidrofóbica, (para- κ caseína) e uma hidrofílica chamada caseínomacropeptídeo, provocando a desestabilização da micela com consequente precipitação da caseína do leite seguida pela agregação, induzida pelo cálcio, dessas micelas alteradas (Ordoñez, 2005; Paula, Carvalho e Furtado, 2009). A produção de coágulos do leite desnatado a partir da protease do látex de *Euphorbia tirucalli*, indica que a tirucalina possui propriedades eficazes para a produção de queijo. De acordo com Mahajan e Chaudhari (2014), ao analisarem a atividade coagulante do leite de quatro membros da família *Euphorbiaceae*, os dados corroboram com os resultados obtidos neste trabalho reforçando o potencial biotecnológico da enzima aplicados em laticínios.

6 CONCLUSÕES

A amostra extraída do látex *E. tirucalli* foi parcialmente purificada e detectada via SDS-PAGE/Zimograma com peso molecular de 70 kDa e caracterizada com base em ensaios enzimáticos, apresentando atividade ótima em pH 5 e

temperatura de 90°C. O pré-tratamento se mostrou eficaz possuindo uma atividade proteolítica estável em amplas faixas de pHs e temperaturas, obtendo até uma estabilidade no tratamento de autoclavagem em condições mais extremas de temperatura.

Através da análise da cinética enzimática obtida pela equação de Michaelis-Menten, a protease mostrou afinidade pelo substrato caseína em diferentes concentrações.

Com base nas características apresentadas neste trabalho, a protease extraída do látex de *E. tirucalli* se mostrou eficaz para aplicações biotecnológicas na indústria alimentícia possuindo atividade coagulante do leite.

7 REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA

ALOO, B. N.; OLUKO, P.; WANJOHI, B. In vitro analysis of antimicrobial and phytochemical properties of crude extracts of selected plants against the tomato wilt disease. African Crop Science Journal, v. 27, n. 3, p. 479-499, 2019.

BADGUJAR, S. B.; MAHAJAN, R. T. Nivulian-II a new milk clotting cysteine protease of *Euphorbia nivulia* latex. International journal of biological macromolecules, v. 70, p. 391-398, 2014.

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

COSTA, L. S. Estudo do uso do Aveloz (*Euphorbia Tirucalli*) no tratamento de doenças humanas: uma revisão. 18 f. TCC (Graduação) - Curso de Ciências Biológicas, Farmácia, Universidade Estadual da Paraíba, 2011.

COSTA, S. L.; JUNIOR, C. L. S. Caracterização de proteases do látex de *Euphorbia tirucalli* para uso biotecnológico. 18ª jornada de iniciação científica. Livro de resumos. p. 233-23, 2019.

CROWDER, J. I.; SEXTON, R. R. Keratoconjunctivitis resulting from the sap of candelabra cactus and the pencil tree. Archives of Ophthalmology, v. 72, n. 4, p. 476-484, 1964.

DUBEY, V. K.; JAGANNADHAM, M. V. Procerain, a stable cysteine protease from the latex of *Calotropis procera*. *Phytochemistry*, v. 62, n. 7, p. 1057-1071, 2003.

DUKE, J. A. *Euphorbia tirucalli* L. Handbook of Energy Crops. 1983. Disponível em: <https://hort.purdue.edu/newcrop/duke_energy/Euphorbia_tirucalli.html>. Acesso em: 17 de abril 2020.

EGITO, A. S. GIRARDET, J.M.; LAGUNA, L. E.; POIRSON, C.; MOLLÉ, D.; MICLO, L.; HUMBERT, G.; GAILLARD, J. L. Milk-clotting activity of enzyme extracts from sunflower and albizia seeds and specific hydrolysis of bovine k-casein. *International Dairy Journal*, v. 17, n. 7, p. 816-825, 2007.

ELZOGHBY, A. O.; EL-FOTOH, W. S. Abo; ELGINDY, N. A. Casein-based formulations as promising controlled release drug delivery systems. *Journal of controlled release*, v. 153, n. 3, p. 206-216, 2011.

FERREIRA, A. F.; FONSECA, K. C.; CANABRAVA, H. A. N.; OLIVEIRA, F. Purificação e caracterização bioquímica parcial de proteases existentes no látex da planta de *Euphorbia milli* des moulins. *Horizonte Científico*, v. 3, n. 2, p. 1-23, 2009.

FRANCO-SALLA, G. B.; PRATES, J.; CARDIN, L. T.; SANTOS, A. R. D.; SILVA, W. A.; CUNHA, B. R.; TAJARA, E. H.; OLIANI, S. M.; RODRIGUES-LISONI, F. C. *Euphorbia tirucalli* modulates gene expression in larynx squamous cell carcinoma. *BMC complementary and alternative medicine*, v. 16, n. 1, p. 136, 2016.

FLEMMING, M.; DOMSALLA, A.; RAWEL, H.; MELZIG, M. F.; Isolation and Characterization of Mauritanicain, a Serine Protease from the Latex of *Euphorbia mauritanica* L. *Planta medica*, v. 234, n. 06, p. 551-556, 2017.

JOÃO, C. A. R. Encapsulação e libertação controlada de fármacos. 99 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Tecnologia Biomédica, Escola Superior de Tecnologia e Gestão Instituto Politécnico de Bragança, 2013.

JUBE, S.; BORTHAKUR, D. Recent advances in food biotechnology research. *Food Biochemistry and Food Processing*, p. 35-70, 2006.

KUNDU, S.; SUNDD, M.; JAGANNADHAM, M. V. Purification and Characterization of a Stable Cysteine Protease Ervatamin B, with Two Disulfide Bridges, from the Latex of *Ervatamia c oronaria*. *Journal of agricultural and food chemistry*, v. 48, n. 2, p. 171-179, 2000.

LAEMMLI, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *nature*, v. 227, n. 5259, p. 680-685, 1970.

LEATHERBARROW, R. J. *Enzfitter Manual*, a non-linear curve fitting program for Windows. Biosoft, London, v. 1104, 1999.

LOKE, J.; MESA, L. A.; FRANKEN, J. F. *Euphorbia tirucalli* biology manual: Feedstock production, bioenergy conversion, application, economics. 2011.

MACIEL, F. M. Identificação de proteases cisteínicas envolvidas em processos de sinalização e defesa em *Ricinus communis* L. 68 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Biociências e Biotecnologia, Universidade Estadual do Norte Fluminense, 2007.

MAHAJAN, R. T.; CHAUDHARI, G. M. Plant latex as vegetable source for milk clotting enzymes and their use in cheese preparation. *International Journal of Advanced Research*, v. 2, n. 5, p. 1173-1181, 2014.

MENEZES, Y. A. S. Extração, caracterização e atividades biológicas de proteínas da espécie *Cnidocolus urens* (L.) Arthur. 107 f. Dissertação (Mestrado) - Ciências farmacêuticas, Universidade Federal do Rio Grande do Norte, 2013.

MILHM, A. C. P. Purificação e caracterização da uma cistatina de folhas modificadas de aveloz (*Euphorbia tirucalli*). 51 f. TCC (Graduação) - Curso de ciências biológicas, Universidade Federal do Estado do Rio de Janeiro, 2017.

MONTEIRO JÚNIOR, J. E.; VALADARES, N. F.; PEREIRA, H. D.; DYSZY, F. H.; COSTA FILHO, A. J. DA; UCHÔA, A. F.; OLIVEIRA, A. S. DE; SILVEIRA CARVALHO, C. P. DA; GRANGEIRO, T. B. Expression in *Escherichia coli* of cysteine protease inhibitors from cowpea (*Vigna unguiculata*): The crystal structure of a single-domain cystatin gives insights on its thermal and pH stability. *International Journal of Biological Macromolecules*, v. 102, p. 29–41, 2017.

MORENO-HERNÁNDEZ, J. M. et al. Exploring the milk-clotting properties of extracts from *Bromelia pinguin* fruit. *Journal of Microbiology, Biotechnology and Food Sciences*, v. 2019, p. 62-66, 2019.

ORLANDA, J. F.; VALE, V. V. Análise fitoquímica e atividade fotoprotetora de extrato etanólico de *Euphorbia tirucalli* Linneau (Euphorbiaceae). *Revista Brasileira de Plantas Mediciniais*, v. 17, n. 4-1, p. 730-736. 2015.

PALIT, P.; MUKHERJEE, D.; MAHANTA, P.; SHADAB, M. D.; ALI N.; ROYCHOUDHURY, S.; ASAD MD.; MANDAL, S. C. Attenuation of nociceptive pain and inflammatory disorders by total steroid and terpenoid fraction of *Euphorbia tirucalli* Linn root in experimental in vitro and in vivo model. *Inflammopharmacology*, v. 26, n. 1, p. 235-250, 2018.

PAULA, J. C. J.; CARVALHO, A. F.; FURTADO, M. M.. Princípios básicos de fabricação de queijo: do histórico à salga. *Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes*, v. 64, n. 367, p. 19-25, 2009.

RAI, R. *Advances in Food Biotechnology*. India: Wiley-blackwell, 2016. 729 p.

RAO, M. B.; TANKSALE, A. M.; GHATGE, M. S.; DESHPANDE, V. V. Molecular and biotechnological aspects of microbial proteases. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, v. 62, n. 3, p. 597-635, 1998.

RASKOVIC, B.; LAZIC, J.; POLOVIC, N. Characterization of general proteolytic, milk clotting and antifungal activity of *Ficus carica* latex during fruit ripening. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, v. 96, n. 2, p. 576-582, 2016.

RODRIGUES, M. L. Produção e caracterização de micropartículas de poliésteres contendo látex da *Euphorbia tirucalli*. 2017. 99 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Ciências e Tecnologias em Saúde, Universidade de Brasília, Brasília, 2017.

SARROUH, B.; SANTOS, T. M.; MIYOSHI, A.; DIAS, R.; AZEVEDO, V. A. C. Up-to-date insight on industrial enzymes applications and global market. *J. Bioprocess. Biotech. S*, v. 4, p. 002, 2012.

SHAH, M. A.; MIR, S. A.; PARAY, M. A. Plant proteases as milk-clotting enzymes in cheesemaking: a review. *Dairy Science & Technology*, v. 94, n. 1, p. 5-16, 2014.

SILVA PEQUENO, V. I. C., CASEIRO, M. M., SOUZA, C. B. Alternativas terapêuticas contra a AIDS desenvolvidas a partir da biotecnologia no Brasil. *Revista Caderno Pedagógico*, v. 14, n. 2, p. 28-44, 2017.

TAVANO, O. L. Protein hydrolysis using proteases: an important tool for food biotechnology. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, v. 90, p. 1-11, 2013.

VALLÉS, D.; FURTADO, S.; CANTERA, A. M. B. Characterization of new proteolytic enzymes from ripe fruits of *Bromelia antiacantha* Bertol. (Bromeliaceae). *Enzyme and Microbial Technology*, v. 40, n. 3, p. 409-413, 2007.

VALUEVA, T. A.; MOSOLOV, V. V. Role of inhibitors of proteolytic enzymes in plant defense against phytopathogenic microorganisms. *Biochemistry (Moscow)*, v. 69, n. 11, p. 1305-1309, 2004.