VII EAITI 2017
ENCONTRO ANUAL DE INICIAÇÃO TECNOLÓGICA E INOVAÇÃO
UNIVERSIDADE ESTADUAL DE PONTA GROSSA
09 e 10 de novembro de 2017

AVALIAÇÃO DA EFICÁCIA DE DIFERENTES CRIOPROTETORES PARA LIOFILIZAÇÃO DE PROTEASES PURIFICADAS POR ULTRAFILTRAÇÃO OBTIDAS DO LÁTEX DE *Tabernaemontana catharinensis E Aspisdosperma olivaceum*

Kathielle Luiza Mucellini (PIBITI/CNPq/UEM), Arildo José Braz de Oliveira (Orientador), ajboliveira@uem.br, Regina Aparecida Correia Gonçalves (Coorientador)

Universidade Estadual de Maringá/Departamento de Farmácia

Área do conhecimento: Bioquímica. Subárea do conhecimento: Química de Macromoléculas - Proteínas

Palavras Chave*: Liofilização, Látex. Proteínas, Sacarose, Tabernaemontana catharinensis.*

Resumo

A liofilização proporciona grande período de prateleira aos produtos e fármacos proteicos, porém pode gerar fontes de auto stress. Sendo assim, avaliou-se por meio de ensaio de atividade enzimática proteolítica e teste T a preservação das proteases obtidas do látex da espécie *Tabernaemontana catharinensis* tratadas com diferente crioprotetores. A técnica foi satisfatória, melhorando a atividade das proteases ao utilizar lactose, Orafti P95 e sacarose, trazendo assim vantagens na preparação e conversação das proteases que passam por liofilização. Já para a *A. olivaceum* não foi possível concluir com os objetivos propostos devido à baixa produção de látex pela planta em estudo.

Introdução

As proteases são enzimas com atividade proteolítica e representam um dos três maiores grupos de enzimas utilizados na indústria, sendo responsáveis por cerca de 60% da venda mundial total das mesmas[1]. Sendo que a liofilização proporciona grande período de prateleira aos produtos e fármacos proteicos, entretanto gera fontes de auto stress, podendo alterar as proteínas ou desestabilizar a formulação em processo[2]. Para contornar este problema, várias substâncias, principalmente carboidratos, são utilizados como crioprotetores, uma vez que são relatados como capazes de conservar propriedades e estruturas proteicas nativas após liofilização[3].

Material e Métodos

O látex foi coletado através de incisões superficiais no caule de *T. catharinensis* e as proteínas precipitadas com acetona 1:3 (V/V). Posteriormente, liofilizadas com os crioprotetores frutooligossacarídeos (orafti P95), inulina, lactose, sacarose, polietilenoglicol 400 (PEG 400), e sorbitol a 10 % (p/p). Uma parte da crioproteção foi realizada com o precipitado acetônico previamente liofilizado e outro sem previa liofilização. Seguido disso, essas frações tiveram a atividade enzimática proteolítica determinada de acordo com Tomarelli (1947)[4].

Resultados Obtidos

A atividade proteolítica da amostra de proteína foi significativamente (p<0,05) maior nas crioprotegida com lactose, fruto-oligossacarídeos (Orafti P95) e sacarose sendo assim, uma alternativa interessante de preparo e conversação das proteases que passarão pelo processo de liofilização. Já as amostras com inulina e sorbitol foram um pouco menos efetivas o e PEG 400 não apresentou resultados satisfatórios (Tabela 1).

TABELA 1 - Atividade proteolítica e especifica das amostras do precipitado acetônico com os crioprotetores sem previa liofilização

Amostra	Atividade Proteolítica (U)	Atividade Especifica (U/mg)
Precipitado acetônico (PA)	1,135 ± 0,04	0,181
PA + Sacarose	1,219 ± 0,09 [a]	0,182
PA + Lactose	1,212 ± 0,06 [a]	0,193
PA + Orafti P95	1,259 ± 0,05 [a]	0,201
PA + Inulina	1,120 ± 0,04	0,178
PA + Sorbitol	1,109 ± 0,06	0,166
PA + PEG 400	0,330 ± 0,01 [a]	0,053
Tripsina	1,473 ± 0,07	0,146

[a] p<0,05 quando comparado ao precipitado acetônico sem criopreservador

Conclusão

Foi observado maior preservação da protease quando a amostra foi crioprotegida logo após a precipitação. Sendo que os dissacarídeos e frutooligossacarídeos mostraram-se mais efetivos do que os polímeros de maior massa molar como a inulina e o PEG 400.

Agradecimentos

CNPq, Fundação Araucária, UEM, UEPG, LABIPROS, PPG, NIT.

1 FEIJOO-SIOTA, L.; VILLA, T. G. Native and Biotechnologically Engineered Plant Proteases with Industrial Applications. **Food and Bioprocess Technology,** v.4, p. 1066–1088, 2010.

2 ABDELWAHED, W.; DEGOBERT, G.; STAINMESSE, S.; FESSI, H.**. Adv. Drug Deliv. Rev. 58, 1688–1713.**, 2006.

3 SOARES, S.; FONTE, P.; COSTA, A.; ANDRADE, J.; SEABRA, V.; FERREIRA, D.; REIS, S.; SARMENTO, B. Effect of freeze-drying, cryoprotectants and storage conditions on the stability of secondary structure of insulin-loaded solid lipid nanoparticles. **International journal of pharmaceutics**, v. 456, n. 2, p. 370-381, 2013.

4CHARNEY, M.S.; TOMARELLI, R.M. A colorimetric method for the determination of the proteolytic activity of duodenal juice. **Journal of Biological Chemistry**, v.171, p.501-505, 1947.