



Estudo da Atividade Proteolítica de Enzimas Presentes em Frutos

Silvio Luís Toledo de Lima, Marcelo Bispo de Jesus, Roberta Regina Ruela de Sousa, André Kimura Okamoto, Renata de Lima e Leonardo Fernandes Fraceto

Este trabalho apresenta um experimento simples que aborda conceitos fundamentais de química, biologia e bioquímica. Seu objetivo é identificar a presença de enzimas proteolíticas em diversos frutos, usando como substrato protéico a gelatina, cuja integridade pode ser facilmente monitorada por meio do processo de gelificação. A metodologia adotada privilegiou assim o uso de procedimentos laboratoriais de fácil execução e de reagentes de baixo custo.

▶ frutos, gelatina, enzimas proteolíticas ◀

Recebido em 13/11/06, aceito em 9/11/07

As proteínas são polímeros que compreendem uma seqüência de dezenas ou centenas de resíduos de aminoácidos (monômeros) ligados por meio de ligações peptídicas.

Dentre as diferentes funções das proteínas no organismo, destaca-se a sua atividade como enzimas ou catalisadores biológicos. Nessa função, sua ação consiste em acelerar a velocidade de uma reação química mediante a diminuição da energia de ativação da reação — sem que, no entanto, seja consumida durante o processo (Figura 1). A manutenção da estrutura tridimensional das enzimas, principalmente de seu sítio catalítico,

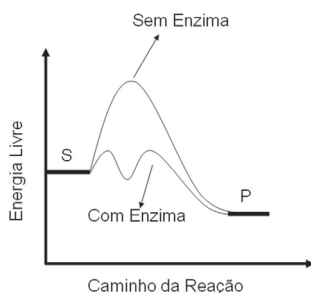


Figura 1: Exemplo do caminho de uma reação sem catalisador e de uma reação com catalisador enzimático.

é vital para o que o processo de catálise possa ocorrer. Contudo, existem diversos fatores que podem causar/provocar modificações estruturais, tais como: a variação de pH, a temperatura, a força iônica.

Algumas enzimas são capazes de quebrar ligações peptídicas de cadeias protéicas, sendo denominadas assim de proteases. A representação de uma reação catalisada por essas enzimas pode ser verificada logo abaixo, na Figura 2.

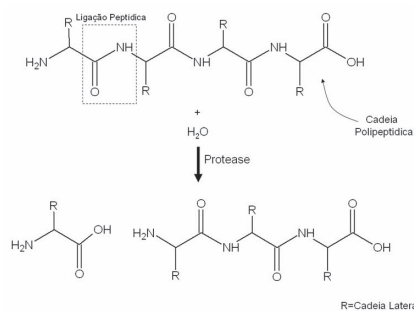


Figura 2: Representação de uma hidrólise protéica catalisada por uma protease.

Na Figura 2, observa-se que a reação catalisada pela protease é uma reação de hidrólise da cadeia polipeptídica (substrato), na qual aminoácidos e cadeias polipeptídicas menores

podem ser gerados como produtos imediatos da reação.

As enzimas proteolíticas são encontradas tanto em animais como em vegetais. Em animais, elas participam de importantes processos biológicos, entre os quais: a digestão protéica, a coagulação sanguínea, a morte celular e a diferenciação de tecidos. Sua atuação no processo digestivo, por exemplo, é essencial para o processo de absorção, pois hidrolisam as proteínas provenientes da alimentação para que seus aminoácidos (monômeros) possam ser absorvidos e reaproveitados pelo organismo. Do mesmo modo, vários processos proteolíticos são importantes durante o mecanismo invasivo de tumores, assim como ao longo do ciclo infeccioso de um grande número de vírus e microrganismos patogênicos. Até mesmo as proteínas que constituem as nossas células são constantemente degradadas por complexos de proteases e, seus constituintes, reaproveitados pelo organismo.

Em vegetais, as enzimas proteolíticas estão envolvidas nos processos de amadurecimento, de germinação, de diferenciação e morfogênese, de morte celular, de resposta de defesa de plan-

tas a processos de estresse oxidativo, entre outros. Algumas enzimas envolvidas no amadurecimento de frutos, como a ficina (figo), a papaína (mamão) e a bromelina (abacaxi), podem ser extraídas em grandes quantidades e representam por isso uma significativa importância econômica.

As enzimas proteolíticas possuem também uma vasta aplicação comercial/industrial, estando entre os três maiores grupos de enzimas industriais e sendo responsáveis por 60% da venda internacional de enzimas. Na indústria alimentícia, as enzimas proteolíticas são largamente utilizadas para o amaciamento de carne e clarificação da cerveja — além do amaciamento de couro. Já na indústria farmacêutica, essas enzimas proteolíticas são empregadas em medicamentos para distúrbios de digestibilidade, tendo também ação antiinflamatória, antimucolítica e cicatrizante.

Destaca-se ainda a utilização de enzimas proteolíticas em diversas receitas caseiras, sendo comum a utilização de leite de mamão e suco de abacaxi para amaciamento de carnes, além daquelas que recomendam o cozimento de carnes juntamente com pedaços dessas frutas. Não por acaso, o abacaxi é servido como sobremesa após uma refeição repleta de carnes, como no caso dos churrascos.

A gelatina, que sevirá como modelo protéico de substrato nesse experimento, é um produto comercial obtido a partir da hidrólise parcial do colágeno. O colágeno é uma proteína presente em tecidos conjuntivos, como os tendões e as cartilagens, na matriz orgânica dos ossos e na córnea dos olhos. Quando hidratada, a gelatina forma uma estrutura definida como gel. Para a obtenção de um gel transparente, homogêneo e flexível a partir da gelatina, é preciso reduzir a temperatura da solução em menos de 30°C. As macromoléculas, como as que constroem as gomas, a gelatina ou a celulose, podem se ligar a moléculas de água, formando uma rede contínua que se estenderia em toda a massa da solução. Dessa forma, para se imobilizar uma grande quantidade de água, são necessárias pouquíssimas macromoléculas graças aos seus numerosos sítios hidrofílicos — os quais, nas proteínas, são

responsáveis por interações químicas como as pontes de hidrogênio com as moléculas de água.

Nesse experimento, portanto, foi estudada a atividade de enzimas proteolíticas presente em alguns frutos, utilizando a gelatina como modelo protéico de substrato. O princípio desse método consiste em monitorar a gelificação, processo que depende da integridade das cadeias poliméricas da proteína. Caso haja alguma fragmentação nas cadeias poliméricas, a formação do gel ficará comprometida, uma vez que o processo de gelificação, conforme o descrito acima, não ocorrerá.

Parte experimental

Material

Abacaxi
Mamão
Morango
Amaciante para carnes
Peneira
Liquidificador (ou *mixer*)
Microondas (pode ser substituído por aquecimento a lamparina)
Geladeira (pode ser substituído por banho de gelo)
Gelatina sem sabor
Tubos de ensaio
Pipetas volumétricas (pode ser substituído por seringas graduadas)
Espátula
Faca
Bastão de vidro
Béquer 500 mL
Canudos plásticos (para refrigerantes)
Caneta utilizada para marcar transparências de retroprojeto

Procedimento experimental

Preparar o suco das frutas previamente picadas, utilizando o liquidificador e um pouco de água. O suco deve ser peneirado e reservado. Em seguida, dissolver aos poucos o pó da gelatina em 200mL de água fria

e colocar essa solução no forno de microondas por 30s, em potência alta. Preparar, então, a seqüência de tubos de ensaios descrita na Tabela 1. A fim de se comparar e concluir sobre os dados finais obtidos, foram preparados dois controles: um negativo e outro positivo. O controle negativo, produzido apenas com gelatina e água, funciona como o “padrão de não-ocorrência de proteólise”. O controle positivo, feito com amaciante de carne que contém a enzima proteolítica papaína que hidrolisa a gelatina, funciona como o “padrão de ocorrência de proteólise”.

A ocorrência ou não da proteólise será avaliada por meio da gelificação, observada indiretamente mediante a viscosidade do meio, esta monitorada pela introdução de canudos plásticos nos tubos de ensaio.

Para avaliar a viscosidade inicial do meio (antes da gelificação), introduz-se em cada tubo de ensaio um canudo plástico. Com uma caneta, anota-se no próprio tubo até onde os canudos se inseriram (Figura 3a).

Feito isso, retirar os canudos e deixar os tubos à temperatura ambiente por 10 min. Depois desse período, os tubos deverão ser colocados na geladeira onde permanecerão por mais 20 min para que ocorra a gelificação.

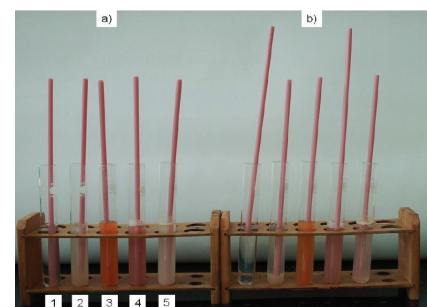


Figura 3: Resultados obtidos no experimento: a) antes e b) depois do processo de gelificação. A numeração de 1 a 5 representa a seqüência dos tubos que serão estudados (1=controle negativo, 2=suco de abacaxi, 3=suco de mamão, 4=suco de morango, 5=controle positivo).

Tabela 1: Seqüência de tubos que serão observados/analísado no experimento.

Tubo	Composição	Teste
1	10mL gelatina + 3mL de água	Controle negativo
2	10mL gelatina + 3mL de suco de mamão	Mamão
3	10mL gelatina + 3mL de suco de morango	Morango
4	10mL gelatina + 3mL de suco de abacaxi	Abacaxi
5	10mL gelatina + ponta de espátula para amaciante de carne dissolvida em 3 mL de água	Controle positivo

Após esse período, deve-se avaliar a gelificação, colocando novamente os canudos plásticos dentro dos tubos de ensaio (Figura 3b) e anotar, com uma caneta, até onde estes se inseriram no interior dos tubos.

Resultados e discussão

A Figura 3a mostra a seqüência de tubos obtida, seguindo os procedimentos descritos na Tabela 1, que caracteriza o estado inicial do experimento. Nessa figura, observa-se uma baixa viscosidade em todos os tubos, uma vez que os canudos atingiram o seu fundo em todas as situações, indicando assim que, nessa etapa, não há a formação de gel. Observa-se ainda que o tubo 1 (controle negativo) é incolor; os tubos 2, 3 e 4 apresentam as cores provenientes dos sucos das frutas (mamão, morango e abacaxi); e o tubo 5 (controle positivo) possui a cor do amaciante para carne.

Após o processo de gelificação (tempo de 20 min na geladeira), os canudos plásticos foram introduzidos novamente em cada um dos tubos. O resultado obtido está apresentado na Figura 3b.

A análise do tubo 1, controle negativo, indica que houve gelificação, isto é, a formação de gel, já que o canudo não tocou o fundo do tubo, isso devido a não-hidrólise da proteína gelatina, uma vez que no meio não existe a presença de enzima proteolítica. Já a do tubo 5, controle positivo (presença de papaína, informado no rótulo do produto), observa-se que, após o período de 20 min sob baixa temperatura, não houve a formação de um gel, uma vez que o canudo tocou o fundo do tubo, indicando assim a baixa viscosidade da solução.

Os controles (negativo e positivo) foram utilizados para analisar o efeito do suco das frutas (mamão, morango e abacaxi) sobre o processo de formação do gel a partir da gelatina.

Para os tubos contendo suco de mamão (2) e suco de abacaxi (4), observa-se que os canudos atingiram o fundo. Essa constatação evidencia que, assim como ocorreu no tubo

controle positivo (5), houve ali a ação das enzimas proteolíticas presentes nesses frutos, que impediram a formação do gel. No tubo 2, a enzima proteolítica presente é a papaína e, no tubo 4, a bromelina, enzimas essas que provocaram a degradação das macromoléculas da proteína presentes na gelatina, causando assim a perda do processo de gelificação.

A análise do resultado obtido no tubo que contém o suco de morango (3) mostra que o canudo não atravessou a mistura do tubo, indicando que, assim como ocorreu no tubo controle negativo (1), não houve hidrólise das macromoléculas responsáveis pelo processo de gelificação. Esse resultado indica que essas enzimas podem estar ausentes no fruto do morango ou existir em concentrações relativamente baixas quando comparadas as de outros frutos como o mamão e o abacaxi.

Nesse experimento, a observação das enzimas proteolíticas presentes em frutos é importante, pois indica a eficácia de sua utilização em algumas situações do cotidiano, uma vez que sucos de frutas, leite de mamão ou produtos contendo enzimas purificadas de frutos, como no caso da papaína, é vastamente usada para amaciar carnes. Nesse caso, a presença da enzima proteolítica (papaína) faz com que ocorra a hidrólise das proteínas presentes na carne (dentre elas o colágeno), de forma que sua consistência fique mais macia.

A utilização dessas enzimas proteolíticas é importante para auxiliar no processo biológico para digestão de proteínas e, portanto, na melhor absorção destas pelo organismo.

Dessa forma, o experimento apresenta assim uma alternativa didática à experimentação de química em escolas do Ensino Médio, na medida em que associa métodos laboratoriais de fácil acesso e execução a um tema cotidiano e interdisciplinar.

Questões propostas

- 1) Quais as frutas utilizadas no experimento que apresentam enzima proteolítica? Como é possível

chegar a essa conclusão?

- 2) Quais variações poderiam ser feitas nesse experimento para evidenciar ainda mais o efeito da enzima? (sugestão: relacione tais variações com os fatores que afetam atividade enzimática).
- 3) Qual seria o resultado esperado caso fosse utilizado suco de figo no experimento? Explique.
- 4) Além das descritas no texto, para quais outros fins essas enzimas proteolíticas poderiam também ser utilizadas?
- 5) Explique por que um fruto possui enzimas proteolíticas (relacionar com processo de amadurecimento).

Sílvio Luís Toledo de Lima, bacharel e licenciado em Química pela Unicamp, mestre em Química Analítica pela Unicamp, é coordenador do curso de licenciatura em Química da Uniso. **Marcelo Bispo de Jesus**, licenciado em Ciências Biológicas pela Unicamp, é mestre e doutorando em Biologia Funcional e Molecular pela Unicamp. **Roberta Regina Ruela de Sousa**, bacharel e licenciada em Ciências Biológicas pela Unesp/Rio Claro, é mestre e doutoranda em Biologia Funcional e Molecular pela Unicamp. **André Kimura Okamoto**, bacharel e licenciado em Química pela Unicamp, mestre em Físico-Química pela Unicamp, é professor no curso de licenciatura em Química da Uniso. **Renata de Lima**, bacharel em Ciências Biológicas e mestre em Genética pela UFSCar, é doutoranda em Genética Médica pela Unicamp e coordenadora do curso de Biotecnologia da Uniso. **Leonardo Fernandes Fraceto** (leonardo@sorocaba.unesp.br), bacharel e licenciado em Química pela Unicamp, mestre e doutor em Biologia Funcional e Molecular pela Unicamp, é professor no curso de Engenharia Ambiental da Unesp/Sorocaba.

Para saber mais

BRACHT, A. e ISHII-IWAMOTO, E.L. *Métodos de laboratório em bioquímica*. São Paulo: Manole, 2003.

RIBEIRO, E.P. e SERAVALLI, E.A.G. *Química de alimentos*. São Paulo: Edgard Blucher, 2004.

RAW, I; MENNUCCI, L. e KRASILCHIK, M. *A biologia e o homem*. São Paulo: Edusp, 2001.

THIS, H. *Um cientista na cozinha*. 3 ed. São Paulo: Ática, 1998.

SAID, S.; PIETRO, R.C.L.R. *Enzimas como agentes biotecnológicos*. Ribeirão Preto: Legis Summa, 2004.

Abstract: *Proteolytic Activity of Fruits Enzymes*. This work describes a simple experiment about fundamental concepts involving chemistry, biology and biochemistry. The aim of this study is to identify the presence of proteolytic activity in fruits using gelatin as substrate, since it is effortless to monitor the formation of gelatinous mass. The methodology applied intends to use simple laboratory equipments; the processes are easy to handle and the supplies are cheap.

Keywords: fruit, gelatin, proteolytic enzymes