

CARACTERIZAÇÃO PARCIAL DA ATIVIDADE PROTEOLÍTICA ALCALINA NO HEPATOPÂNCREAS DO GUAIAMUM (*Cardisoma guanhumi*)

RANILSON DE S. BEZERRA⁽¹⁾
RODRIGO B. DE ALENCAR⁽²⁾
SUELANE RENATA DE A. SILVA⁽³⁾
JOSÉ ROBERTO B. DE SOUZA⁽⁴⁾

1 Departamento de Bioquímica

Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami, LIKA/UFPE

2 - Departamento de Pesca, Bolsista
PET/SESu/UFPE

3 - Departamento de Nutrição, Acadêmica/UFPE

4 - Departamento de Zoologia/UFPE

Email: mailto:ransoube@uol.com.br

RESUMO

Foram investigados o efeito do pH, temperatura, inibidores e substratos sobre a atividade proteolítica no extrato bruto do hepatopâncreas do guaiamum (*Cardisoma guanhumi*), um decápode semi-terrestre de importância econômica no Brasil. O pH ótimo foi entre 7,0 e 9,5. A temperatura ótima foi de 55°C. Esta atividade proteolítica permaneceu inalterada após 30 min de incubação nesta temperatura. O emprego de substratos e inibidores clássicos de protease apresentaram fortes evidências que serino-protease, cisteíno-protease, metalo-protease, estão presentes no extrato bruto em estudo. Estes dados podem colaborar para o entendimento da digestão protéica, fato que contribuirá para a otimização do cultivo racional desta espécie.

Palavras chaves: protease, caranguejo, Crustacea, guaiamum, *Cardisoma*

ABSTRACT

Partial characterization of the alkaline proteolytic activity from guaiamum (*Cardisoma guanhumi*) hepatopancreas

The effect of pH, temperature and substrates on proteolytic activity of crude extract from hepatopancreas of semi-terrestrial crab (*Cardisoma guanhumi*), an important Brazilian decapod, was investigated. The optimum pH was between 7.0 and 9.5. The optimum temperature was 55°C. This proteolytic activity remained unaltered after 30 min incubation at this temperature. The use of substrates and classic protease inhibitors showed strong evidences that serino-protease, cysteine-protease, metalo-protease, are present in the crude extract studied. These data can be collaborate to the protein digestion understand and to contribute for the rational culture of this specie.

Key-words: protease, Crustacea, semi-terrestrial crab, *Cardisoma*

INTRODUÇÃO

O guaiamum *Cardisoma guanhumi* ocorre em todo Atlântico tropical ocidental, desde a Flórida até Santa Catarina. Possui hábito semi-terrestre, vivendo preferencialmente em áreas de transição entre o manguezal e o ambiente terrestre. Possui hábito alimentar onívoro consumindo folhas, sementes, frutas, pequenos organismos e até cadáveres (Herreid, 1963; Henning, 1975). Entretanto, ainda não se sabe com certeza o seu hábito alimentar funcional. Ele é um importante componente do elo da cadeia alimentar, sendo consumido por várias aves e mamíferos.

O conhecimento das propriedades das enzimas proteolíticas digestivas, representa uma importante informação para uma correto balanceamento protéico da dieta de uma espécie (Caruso et al., 1996). Além de também ser importante para o entendimento da perda de textura da carne durante o processamento industrial (Dionysius et al., 1994).

C. guanhumi possui um ótimo padrão comercial sendo cultivado e consumido na região nordeste do Brasil, apresentando fatores que objetivam o estudo da caracterização parcial das suas proteases digestivas, que contribuirá para um melhor dimensionamento nas formulações de dietas artificiais, visando assim o seu cultivo racional.

MATERIAL E MÉTODOS

Coleta do hepatopâncreas e preparação dos extratos brutos

Foram utilizados 4 espécimes de *C. guanhumi* coletados no estuário de Itapissuma-PE. No Laboratório de Fisiologia e Ecologia de Peixes (LAFIPE) do Departamento de Pesca/UFRPE, os animais foram anestesiados e sacrificados através de imersão no gelo (0°C), sendo os hepatopâncreas processados no Laboratório de Enzimologia do Departamento de Bioquímica da UFPE, segundo Bezerra *et al.* (2000). Após a retirada dos hepatopâncreas, foram preparadas os extratos brutos, sendo as amostras homogeneizadas em solução salina (NaCl 0,9% em 25 partes) através da utilização de um homogeneizador elétrico, e em seguida, acondicionadas a – 20°C até a sua utilização em ensaios enzimáticos.

Os extratos brutos foram levados para o Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami (LIKA/UFPE), onde iniciou-se o processo de determinação das atividades proteolíticas, utilizando-se a metodologia descrita por Bezerra *et al.* (2000; 2001). Em um microtubo, adicionou-se 40µL de azocaseína a 1% (p/v) preparada em solução tampão Tri-HCl 0,2M (pH 7,2 a 25°C) e 50µL do extrato bruto (enzima), incubando-se por 60 min. Em seguida, a reação foi interrompida através da adição de ácido tricloroacético (TCA) 10% p/v, deixando em repouso por 15 min. Após este procedimento, centrifugou-se (25°C) cada amostra em uma microcentrifuga (BioRad) por 15 min. a 8000xg. e retirou-se alíquotas de 70µL do sobrenadante. Estas foram introduzidas em micropoços de uma placa de ELISA, onde posteriormente adicionou-se 130µL de NaOH 1Mol/L. Ainda nesta placa, as absorbâncias foram determinadas a 440nm em um leitor de ELISA (BioRad).

Caracterização da atividade proteolítica dos Extratos Brutos

Parâmetros físico-químicos como: temperatura ótima, estabilidade térmica, pH ótimo e o efeito de inibidores foram determinados segundo metodologia descrita por Bezerra *et al.* (2000; 2001).

Análise estatística

Empregou-se estatística básica e o teste de ANOVA, utilizando o software MicroCal Origin.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

De acordo com a Figura 1A, a atividade proteolítica nos extratos brutos do hepatopâncreas do guaiamum *C. guanhum* apresentou uma variação de pH ampla (7,0 – 9,0). Não observou-se diferenças estatisticamente significativas (ANOVA, $P > 0,05$) entre as médias. Este perfil tem sido encontrado em outros animais ectotérmicos tropicais, como por exemplo o tambaqui (*Colossoma macropomum*), que teve suas proteases digestivas estudadas por Bezerra *et al.* (2000). Provavelmente, deve-se ao fato dos ensaios serem realizados com extratos brutos, onde há a ocorrência de mais de uma protease. Comprovando esta informação, um pH ótimo de 8,0 foi observado para a tripsina purificada no hepatopâncreas do caranguejo *Portunus pelagicus* (Dionysius *et al.* 1994) e 9,5 para a tripsina purificada dos cecos pilóricos de *C. macropomum* (Bezerra *et al.* 2001).

Em pH 7,2 e temperatura de 25°C, a atividade proteolítica demonstrou ser relativamente baixa (6,4 U/mL, conforme apresentado na Tabela 1), cerca de 25% da atividade na temperatura ótima, que foi de 55°C (Figura 1B), e cerca de 10% do valor encontrado para o tambaqui *C. macropomum* nas mesmas condições. A tripsina do caranguejo *P. pelagicus* apresentou temperatura ótima de 60°C, sendo que a atividade na temperatura ambiente (25°C) foi de aproximadamente 40% da máxima. Estes fatos fornecem evidências de que *C. guanhum* possui certa dificuldade na digestão protéica em seu ambiente natural. Esta atividade proteolítica apresentou resistência térmica quando exposta a temperatura de 55°C por um período de 30 min (Figura 1C).

Adaptações fisiológicas às condições ambientais em animais ectotérmicos têm sido estudadas (Arruchalam & Haard, 1985; Simpson & Haard, 1987; Ásgeirsson *et al.* 1989; Raa, 1990; De Vecchi & Coppes, 1996) o que se demonstrou foi que enzimas de espécies que habitam ambientes frios, frequentemente apresentam atividades enzimáticas maiores em baixas temperaturas, o contrário ocorrendo com os que habitam regiões tropicais, como exemplo podemos citar os casos do tambaqui *C. macropomum* (Bezerra *et al.* 2000; 2001), do mugilídeo *Mugil cephalus* (Guizani *et al.* 1992), do híbrido de tilapia *Oreochromis niloticus/aurea* (El-Shemy. & Levin., 1997) e do camarão da Malásia *Macrobrachium rosenbergii* (Nip *et al.* 1985). Pouco se tem encontrado na literatura com respeito a proteases de caranguejos tropicais.

Conforme apresentado na Tabela 1, os inibidores de protease utilizados (PMSF, EDTA e E64) nas concentrações de 1 mM/L, foram capazes de reduzir as atividades proteolíticas nos extratos brutos. Sendo que o PMSF e o EDTA inibiram mais intensamente (cerca de 54% e 46%, respectivamente) do que o E64 (cerca de 23%); confirmando a presença de serino-protease, metalo-protease e cisteíno-protease nas amostras em estudo.

As serinoproteases (inibidas por PMSF), são enzimas que possuem um mecanismo catalítico em comum caracterizado pela presença de um grupamento serino no seu centro ativo, apresentam uma ampla distribuição entre os animais, onde são produzidas a partir de várias fontes e com diversas funções. Em animais aquáticos, tripsina, quimiotripsina e elastase, que atuam em grupamentos lisina ou arginina, fenilalanina e elastina, respectivamente, compreendem, as proteases do trato digestivo mais citadas e estudadas desta família. A inibição por EDTA, que é um agente quelante, indica que a enzima é dependente de íons metálicos. Este fato é bem comum em animais marinhos. Já a inibição por E64, não é tão comum entre estes animais (Kolodziejska & Sikorski, 1996; De Vecchi & Coppes, 1996).

Esses resultados podem colaborar para o melhor entendimento da digestão protéica em *C. guanhum*, fato que contribuirá para a otimização do cultivo racional desta espécie.

Tabela 1 – atividades Proteolíticas no trato digestivo do guaiamum *C. guanhum*. Azocaseína 1% p/v como substrato e suas inibições por: PMSF, EDTA e E-64 nas concentrações de 1 mMol/L.

ESPÉCIE	ÓRGÃO	ATIVIDADE PROTEOLÍTICA U/mL	PMSF	EDTA INIBIÇÃO ^(*) %	E-64
Guaiaumum (<i>Cardisoma guanhum</i>)	Hepatopâncreas	6.4	53.9±11.0	45.6±13.6	22.7±5.7

(*) As amostras (15µL) foram incubadas a 37°C durante 30 min com os respectivos inibidores (15µL) dissolvidos em dimetil-sulfoxido (DMSO), em seguida as atividades proteolíticas foram determinadas conforme descrito em material e métodos. O 100% foi obtido através da incubação da amostras (15µL) com DMSO (15µL) durante 30 min, e determinação proteolítica como descrito anteriormente.

PMSF – fluoreto de fenil-metil-sufonil

EDTA – ácido etileno-di-amino-tetra-acético

E64 – L-3-carboxi-trans-2,3 epoxipropil- leucilamide 4 guanidino butano

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem à colaboração das Prof.as. do Departamento de Pesca Marilena Ra mos Porto e Girlene Fábila Segundo Viana, pela ajuda na identificação do hepatopâncreas na espécie estudada.

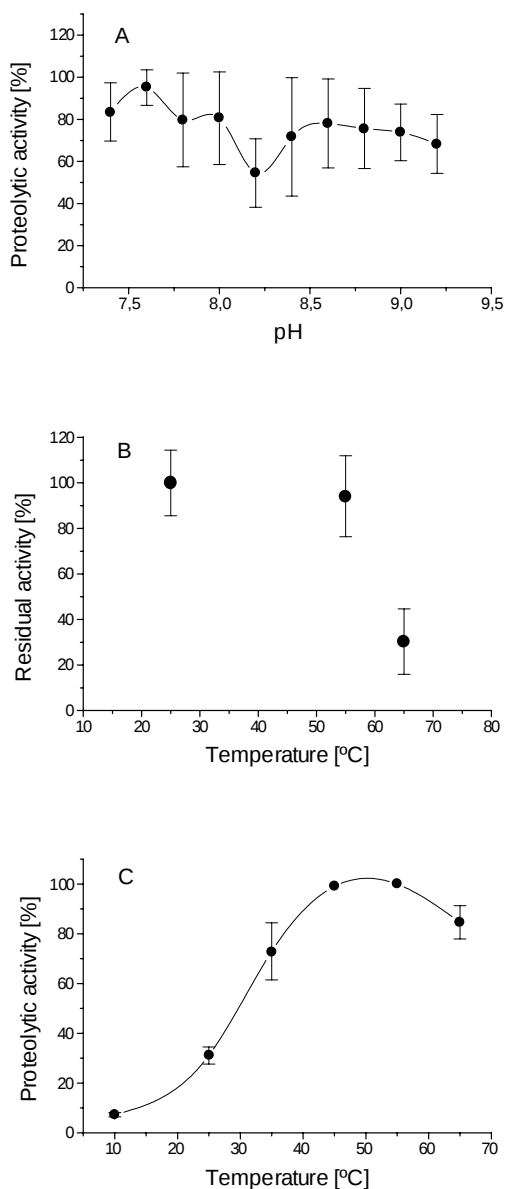


Figura 1 – Efeito do pH (A), estabilidade térmica por 30 min (B), e temperatura (C) na atividade proteolítica alcalina do hepatopâncreas de *C. guanhumu* (n=4). Azocaseína como substrato.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ARRUNCHALAM, K.; HAARD, N. F. Isolation and characterisation of pepsin from polar cod *Boreogadus saida*. **Comp. Biochem. Physiol.** UK v. 80B, n. 3, p. 467-473, 1985.

- ÁSGEIRSSON, B.; FOX, J. W.; BJARNASON, J. B. Purification and characterisation of trypsin from poikilotherm *Gadus morhua*. **Eur. J. Biochem.** v. 180, p. 85-94, 1989.
- BEZERRA, R. S.; DOS SANTOS, J. F.; LINO, M. A. S.; VIEIRA, V. L.; CARVALHO JR, L. B. Characterization of stomach and pyloric caeca proteinases of tambaqui (*Colossoma macropomum*). **Journal of Food Biochemistry** USA. v. 24, n. 2, p.189-199 2000.
- BEZERRA, R. S.; SANTOS, J. F.; PAIVA, P. M. G.; CORREIA, M. T. S.; COELHO, L. C. B. B.; VIEIRA, V. L. A.; CARVALHO JR, L. B. Partial purification and characterization of a thermostable trypsin from pyloric caeca of tambaqui (*Colossoma macropomum*). **Journal of food Biochemistry** USA v. 25, n. 3, 199-210, 2001.
- CARUSO, G.; GENOVESE, L.; GRECO, S. Preliminary investigation on the digestive enzymes of reared *Pagellus acarne* (Risso, 1826) juveniles in relation to two different diets. **Oebalia** Italia 22: 3-13, 1996.
- DE VECCHI, S.; COPPES, Z. Marine fish digestive proteases – relevance to food industry and the south-west Atlantic region – a review. **J. Food Biochem.** USA v. 20, p. 193-214, 1996.
- DIONYSIUS, D. A.; HOEK, K. S.; MILNE, J. M.; SLATTERY, S. L. Trypsin-like enzyme from sand crab (*Portunus pelagicus*): purification and characterisation. **J. Food Sci.** v. 58, n. 4, p. 780-784, 1994.
- EL-SHEMY, M. G.; LEVIN, R. E. Characterization of affinity-purified trypsin from hybrid tilapia (*Tilapia nilotica/aurea*). **Journal of Food Biochemistry** USA v. 21, p. 63-175, 1997.
- GUIZANI, N.; ROLLE, R. S.; MARSHALL, M. R.; WEI, C. I. Isolation, purification and characterisation of a trypsin from the pyloric caeca of mullet (*Mugil cephalus*). **Comp. Biochem. Physiol.** UK v. 98B, n. 4, p. 517-521, 1991.
- HENNING, H. G. Oekologische, ethologische und sinnesphysiologische untersuchungen an der landkrabbe *Cardisoma guanhumi* Latreille (Decapoda, Brachyura). **Forma et Functio** v. 8, p. 253-304, 1975.
- HERREID, C. F. II. Observations on the feeding behavior of *Cardisoma guanhumi* (Latreille) in southern Florida. **Crustaceana**, v. 5, p. 176-180, 1963.
- KOŁODZIEJSKA, I.; SIKORSKI, Z. E. The digestive proteases of marine fish and invertebrates. **Bull. Sea Fish Inst.** v. 137, n. 1, p. 51-56, 1996.
- NIP, W. K.; ZAN, C. Y.; MOY, J. H. Partial characterization of a collagenolytic enzyme fraction from hepatopancreas of freshwater prawn, *Macrobrachium rosenbergii*. **Journal of Food Science.** v. 50, p. 1187-1188, 1985.
- RAA, J. **Biotechnology in aquaculture and the fish processing industry: a success story in Norway.** In **Advances in Fisheries Technology and Biotechnology for Increased Profitable**; VOIGT, M.N., 1990.
- SIMPSON, B. K.; HAARD, N. F. **Cold-adapted enzymes from fish.** In **Food Biotechnology**; KNORR, D. (Dekker, New York ed), 1987, p. 495-528.