

PROTEASES INTESTINAIS DE *Oreochromis niloticus* SENSÍVEIS AO ALUMÍNIO

Raquel Pereira Freitas da SILVA ¹, Vagne de Melo OLIVEIRA ¹,
Ranilson de Souza BEZERRA ¹

¹ Laboratório de Enzimologia, Departamento de Bioquímica e Fisiologia, Universidade Federal de Pernambuco
Endereço/Address: Av. Prof. Moraes Rego, 1235, Cidade Universitária, Recife, PE, Brasil
e-mail: vagne_melo@hotmail.com

Palavras-chave: Biomarcador; metal pesado; protease digestiva; tilápia.

INTRODUÇÃO

Atualmente, vários trabalhos com biomonitoramento utilizando peixes da espécie *Oreochromis niloticus* têm sido realizados, através de marcadores fisiológicos e funcionais. Para tanto, enzimas digestivas de peixes de água doce, como a tilápia-do-nylo, têm sido pouco exploradas como uma dessas ferramentas (OLIVEIRA, 2011). A quimotripsina (EC, 3.4.21.1) é uma endopeptidase membro da família de serinoproteases, armazenada no pâncreas na forma de um precursor, o quimotripsinogênio, ativada através de um efeito cascata a partir da ativação da tripsina (RAO *et al.*, 1998). Ao sofrer clivagem com a tripsina, a quimotripsina é quebrada em duas partes, que ainda ficam atreladas por uma ligação dissulfeto. Quando o quimotripsinogênio quebrado perde dois peptídeos pequenos, numa etapa chamada trans-proteólise, obtém-se a quimotripsina. É uma enzima específica para a hidrólise de ligações peptídicas em que grupos carboxila são fornecidos por um dos três aminoácidos aromáticos, ou seja, fenilalanina, tirosina e triptofano (KUZ'MINA e GOLOVANNOVA, 2004). A principal ação da quimotripsina é denominada tríade-catalítica, uma rede de ligações de hidrogênio entre a Ser¹⁹⁵, His⁵⁷ e a Asp¹⁰². Tanto ela quanto a tripsina contêm a mesma "tríade" de resíduos cataliticamente ativos (EISENMENGER e REYES-DE-CORCUERA, 2009).

MATERIAL E MÉTODOS

Os animais utilizados foram provenientes da estação de aquicultura da Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE). Para tanto, foram cultivados 90 peixes, machos e fêmeas, durante um período de 456 horas, sendo 120 horas de adaptação e 336 de exposição ao contaminante, em aquários com 90 litros de água, todos com alimentação *ad libitum*, troca

dinâmica da água (80%) a cada 24 horas com reposição do metal nos aquários de exposição, limpeza periódica para evitar sujidades e fotoperíodo de 12:12 horas. Os animais foram divididos em 3 grupos experimentais, sendo o grupo controle (sem exposição ao metal): 10,28 cm; 22,13 g; 27,29 °C; pH 6,50; O.D. 80,48%; grupo exposto a 1 ppm de sulfato de alumínio [Al₂(SO₄)₃]: 10,19 cm; 38,0 g; 27,38 °C; pH 6,13; O.D. 77,77%; e grupo exposto a 3 ppm de Al₂(SO₄)₃: 10,48 cm; 24,0 g; 27,30 °C; pH 6,26; O.D. 76,75%. Após o período de cultivo, os animais foram sacrificados por choque térmico, suas vísceras intestinais foram coletadas, maceradas e homogeneizadas em tampão Tris-HCl 0,01M pH 8,0 com 0,9% de NaCl (p/v), obtendo-se o extrato bruto. A atividade enzimática foi determinada utilizando 170 µL de tampão Tris-HCl 0,01M pH 8,0, 30 µL de extrato e 30 µL de BApNA e de Suc-Phe-p-Nan para a tripsina e quimotripsina, respectivamente, como substratos específicos. Após o período de incubação de 15 min., as amostras foram lidas no ELISA com comprimento de onda de 405 nm de absorbância (CASTILLO-YAÑEZ *et al.*, 2009).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Quimotripsinas de peixes apresentam peso molecular variando entre 22 e 30,00 kDa, temperatura ótima oscilando de 45 a 55 °C, e pH ótimo entre 7 e 9 (ALENCAR *et al.*, 2003; CASTILLO-YAÑEZ *et al.*, 2009). Esta enzima tem sensibilidade a determinados inibidores específicos, tais como tosil fenilalanina clorometil cetona (TPCK, inibidor de serinoproteases), N-carbobenzoyl-L-phenylalanine clorometil cetona (ZPCK, inibidor de quimotripsina-like) e inibidor de tripsina de soja (SBTI). São sensíveis a diversos íons metálicos, tais como Ca²⁺ e Mg²⁺, enquanto que inativados pelos íons Fe²⁺, Mn²⁺, Cu²⁺ e Zn²⁺ (YANG *et al.*, 2009). São instáveis em temperaturas acima de 55 °C e em condições ácidas (DE VECCHI e COPPES, 1996), além de hidrolisar substratos sintéticos, como o N-succinyl-Ala-Ala-Pro-Phe-pNa (SApNA) e o Succinil fenilalanina ρ -nitroanilida (Suc-Phe-p-Nan) (CASTILLO-YAÑEZ *et al.*, 2009).

A atividade residual encontrada para a tripsina foi de 100%, 95% e 91%, enquanto que para a quimotripsina foi de 100%, 92% e 73%, para os grupos controle, com 1 ppm e com 3 ppm, respectivamente. A ação inibitória do metal na concentração de 1 ppm foi de 5,49±0,55% e 7,91±0,33 para a tripsina e quimotripsina, respectivamente. Já a encontrada para a concentração de 3 ppm foi de 9,23±0,59% e 26,51±1,82% para a tripsina e quimotripsina, respectivamente.

CONCLUSÃO

Os resultados sinalizam a viabilidade da utilização da tilápia nilótica, através de avaliações das proteases digestivas, como bioindicadora da presença de alumínio no meio aquático.

REFERÊNCIAS

- ALENCAR, R.B.; BIONDI, M.M.; PAIVA, P.M.G.; VIEIRA, V.L.A.; CARVALHO, L.B. JR.; BEZERRA, R.S. 2003 Alkaline proteases from digestive tract of four tropical fishes. *Brazilian Journal of Food Technology*, 6(2): 279–284.
- CASTILLO-YAÑEZ, F.J.; PACHECO-AGUILAR, R.; LUNGO-SANCHEZ, M.E.; GARCIA-SANCHEZ, G.; QUINTERO-REYS, I.E. 2009 Biochemical characterization of an isoform of chymotrypsin from the viscera of Monterey sardine (*Sardinops sagax caerulea*), and comparison with bovine chymotrypsin. *Food Chemistry*, 112(3): 634–639.
- DE VECCHI, S. e COPPES, Z. 1996 Marine fish digestive proteases - relevance to food industry and the southwest Atlantic region - a review. *Journal of Food Biochemistry*, 20(1): 193–214.
- EISENMENGER, M.J. e REYES-DE-CORCUERA, J.I. 2009 High pressure enhancement of enzymes: A review. *Enzyme and Microbial Technology*, 45(5): 331–347.
- KUZ'MINA, V.V. e GOLOVANNOVA, I.L. 2004 Contribution of prey proteinases and carbohydrases in fish digestion. *Aquaculture*, 234: 347–360.
- OLIVEIRA, V.M. 2011 *Aplicação de hidrolases de tilápias-do-nilo (Oreochromis niloticus) como biomarcadores de exposição ao alumínio*. 77p. (Dissertação de Mestrado em Ciências Biológicas. Universidade Federal de Pernambuco).
- RAO, M.B.; TANKSALE, A.M.; GHATGE, M.S.; DESHPANDE, V.V. 1998 Molecular and biotechnological aspects of microbial proteases. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 62(3): 597–635.
- YANG, F.; SU, W-J.; LU, B-J.; WU, T.; SUN, L.C.; HARA, K.; CAO, M.-J. 2009. Purification and characterization of chymotrypsins from the hepatopancreas of crucian carp (*Carassius auratus*). *Food Chemistry*, 116(4): 860–866.