

## EFEITO DO ALUMÍNIO NA ATIVIDADE DA AMILASE INTESTINAL DA TILÁPIA-DO-NILO (*Oreochromis niloticus*)

Vagne de Melo OLIVEIRA<sup>1</sup> e Ranilson de Souza BEZERRA<sup>1</sup>

<sup>1</sup> 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

Os peixes, diferentemente dos mamíferos, não possuem atividade de amilase salivar, sendo a produção desta enzima restrita ao pâncreas e intestino, sobretudo em animais onívoros e herbívoros (ALARCÓN *et al.*, 2001), como é o caso do tambaqui (*Colossoma macropomum*) e da tilápia nilótica (MOREAU *et al.*, 2001; OLIVEIRA, 2011), espécies onívoras, apresentando maior atividade enzimática na região dos cecos pilóricos e intestino proximal. Peixes carnívoros e os de águas frias apresentam limitada secreção e atividade de amilase no trato intestinal, o que é suficiente apenas para digerir uma pequena quantidade de carboidratos, atacando as ligações glicosídicas  $\alpha$ -1,4 e produzindo a partir do amido uma variedade de oligossacarídeos. O aumento da produção de amilase pode ocorrer em resposta à presença de carboidratos ou de produtos da sua hidrólise no lúmen do trato gastrintestinal (MOREAU *et al.*, 2001).

As amilases são divididas em dois grupos: as endoamilases e as exoamilases. As endoamilases catalisam hidrólises de forma aleatória no interior da molécula do amido. Essa ação causa a formação de ramos lineares de oligossacarídeos de cadeias de vários comprimentos e dessa forma quebram as ligações glicosídicas  $\alpha$ -1,4 presentes na parte interna (endo) das cadeias de amilose ou amilopectina. A  $\alpha$ -amilase é a endoamilase mais conhecida. As exoamilases hidrolisam exclusivamente ligações glicosídicas  $\alpha$ -1,4, como a  $\beta$ -amilase ou ambas as ligações  $\alpha$ -1,4 e  $\alpha$ -1,6, como amiloglicosidase e glicosidase (GUPTA *et al.*, 2003).

A atividade amilolítica intestinal pode ser inibida pela ação de inibidores específicos de  $\alpha$ -amilase tipo I. O pH ótimo desta enzima varia de acordo com a espécie, entre 6 e 9, enquanto a temperatura ótima situa-se entre 25 e 55 °C - na tilápia nilótica é de aproximadamente 32 °C -, embora espécies como pargo (*Pagrus pagrus*) e sargo-alcorraz

(*Diplodus annularis*) permaneçam estáveis a temperaturas superiores a 60 °C (HIDALGO *et al.*, 1999; ALARCÓN *et al.*, 2001; FERNÁNDEZ *et al.*, 2001). O peso molecular desta enzima vai variar de acordo com a origem em questão, entre 10 e 210,00 kDa. As  $\alpha$ -amilases microbianas apresentam peso molecular entre 50 e 60,00 kDa, sendo que as  $\alpha$ -amilases bacterianas apresentam variação de 28 a 78,00 kDa e as  $\alpha$ -amilases fúngicas de 41 a 69,00 kDa. Em alguns peixes, como a dourada *Sparus aurata* (ALARCÓN *et al.*, 2001), o peso molecular da enzima é maior que 100,00 kDa. Este trabalho teve por objetivo avaliar a atividade da amilase intestinal de alevinos de tilápias-do-Nilo (*Oreochromis niloticus*) expostas ao Sulfato de Alumínio [Al<sub>2</sub>(SO<sub>4</sub>)<sub>3</sub>] em concentrações definidas de 1 e de 3 µg/mililitro.

## MATERIAL E MÉTODOS

Os animais utilizados foram provenientes da estação de aquicultura da Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE). Para tanto, 90 peixes, machos e fêmeas, foram cultivados 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: 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 µg/mL de sulfato de alumínio [Al<sub>2</sub>(SO<sub>4</sub>)<sub>3</sub>]: 10,19 cm; 38,0 g; 27,38 °C; pH 6,13; O.D. 77,77%; e grupo exposto a 3 µg/mL de Al<sub>2</sub>(SO<sub>4</sub>)<sub>3</sub>: 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 da amilase foi determinada utilizando-se amido 2% como substrato: 60 µL extrato bruto intestino foram incubados com 375 µL solução de amido e 375 µL 10 mM de tampão fosfato pH 8,0 contendo 15mM NaCl a 25 °C. Após 20 minutos, 3,5-dinitro ácido salicílico (DNSA) foi adicionado à solução, sendo esta submetida a 100 °C por 10 minutos. A absorbância utilizada para a leitura foi de 570 nm contra um branco preparado similarmente, exceto que o extrato bruto da amostra foi substituído por tampão fosfato 10 mM. Atividade enzimática foi realizada em triplicatas. Uma unidade de atividade enzimática foi definida como a quantidade de enzima necessária para hidrolisar 1 mg de maltose por miligrama de proteína por minuto (BERNFELD, 1955).

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados do presente trabalho indicam inibição da atividade enzimática. Os valores registrados foram de  $100,0 \pm 0,32\%$ ;  $87,21 \pm 5,76\%$  e  $60,20 \pm 3,95\%$ , respectivamente, para os grupos controle, exposto à concentração de 1  $\mu\text{g/mL}$  e exposto à concentração de 3  $\mu\text{g/mL}$  de sulfato de alumínio  $[\text{Al}_2(\text{SO}_4)_3]$ . Íons de  $\text{Al}^{3+}$ ,  $\text{Ag}^{2+}$ ,  $\text{Hg}^{2+}$ ,  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Mn}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$ ,  $\text{Fe}^{3+}$ ,  $\text{Cd}^{2+}$ ,  $\text{Pb}^{2+}$  e de  $\text{Co}^{2+}$  são inibidores em potencial para esta enzima, enquanto  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{K}^+$  e  $\text{Mg}^{2+}$  ativam ou pelo menos conferem estabilidade para sua atividade (GUPTA *et al.*, 2003; OLIVEIRA, 2011). Os resultados sugerem uma nova ferramenta biomarcadora de exposição ao alumínio. Para tanto, nossas pesquisas devem ser realizadas com outras espécies, a fim de ampliar as informações acerca desta enzima e suas aplicações biotecnológicas.

## REFERÊNCIAS

- ALARCÓN, F.J.; MARTINEZ, T.F.; DÍAZ, M.; MOYANO, F.J. 2011 Characterization of digestive carbohydrase activity in the gilthead seabream (*Sparus aurata*). *Hydrobiologia*, 445(1-3): 199-204.
- BERNFELD, P. 1955 *Enzymes of carbohydrate metabolism*. *Meth. Enzym.*, 1, 149-541.
- FERNANDES, I.; MOYANO, F.J.; DÍAZ, M.; MARTINEZ, T. 2001 Characterization of  $\alpha$ -amylase activity in five species of Mediterranean sparid fishes (Sparidae, Teleostei). *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 262(1): 1-12.
- GUPTA, R.; GIGRAS, P.; MOHAPATRA, H.; GOSWAMI, V.K.; CHAUAN, B. 2003 Microbial  $\alpha$ -amylases: a biotechnological perspective. *Process Biochemistry*, 38(11): 1599-1616.
- HIDALGO, M.C.; UREA, E.; SANZ, A. 1999 Comparative study of digestive enzymes in fish with different nutritional habits. Proteolytic and amylase activities. *Aquaculture*, 170(3-4): 267-283.
- MOREAU, Y.; DESSEAUX, V.; KOUKIEKOLO, R.; MARCHIS-MOUREN, G.; SANTIMONE, M. 2001 Starch digestion in tropical fishes: isolation, structural studies and inhibition kinetics of  $\alpha$ -amylases from two tilapias *Oreochromis niloticus* and *Sarotherodon melanotheron*. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part B*, 128(3): 543-552.
- 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).