CARACTERIZAÇÃO PARCIAL DE TRIPSINA EXTRAÍDA DE VÍSCERAS DIGESTIVAS DE *Lutjanus synagris*: SENSIBILIDADE A ÍONS METÁLICOS

O *Lutjanus synagris* distribui-se ao longo da costa nordestina, apresentando grande importância comercial e artesanal. Este trabalho objetivou extrair e avaliar sensibilidade da tripsina de *Lutjanus synagris* através da exposição a diferentes íons metálicos: $MnCl_2$, KCl , $ZnCl_2$, $FeCl_3$, $CuCl_2$, $CaCl_2$, $BaCl_2$ e $AlCl_3$, em cinco concentrações (0,001, 0,01, 0,1, 1 e 10 mM). Para tanto, foram utilizados 500g de vísceras intestinais de espécimes capturadas no litoral alagoano. A etapa de extração enzimática foi realizada através de processo de maceração e homogeneização. A etapa de sensibilidade foi realizada de acordo com protocolo padrão científico internacional. Os resultados indicaram diferentes graus de inibição para os íons: KCl , $ZnCl_2$, $FeCl_3$ e $CuCl_2$. Os dados obtidos pelo $CaCl_2$ variaram de acordo com as concentrações testadas (0,001, 0,01 e 0,1 provocaram inibição, enquanto que 1 e 10 mM provocaram aumento de atividade, levando em consideração o grupo controle 100%). Todas as concentrações do $MnCl_2$ acarretaram em aumento da atividade, enquanto todos de $CuCl_2$ acarretaram em redução. Os íons $BaCl_2$ e $AlCl_3$ também acarretaram redução de atividade, embora sem haver diferença significativa. Os resultados obtidos sugerem diferentes graus de relação em diferentes concentrações de exposição, transformando a tripsina em um marcador bioquímico de possíveis alterações para elementos metálicos.

PALAVRAS-CHAVES: Marinho; Peixe; Enzima Digestiva.

PARTIAL CHARACTERIZATION OF TRYPSIN EXTRACT OF GUTS OF DIGESTIVE *Lutjanus synagris*: SENSITIVITY METAL IONS

ABSTRACT

The Snapper *synagris* is distributed along the northeastern coast, with large commercial and artisanal importance. This study aimed to extract and evaluate the trypsin sensitivity of *Lutjanus synagris* through exposure to different metal ions: $MnCl_2$, KCl , $ZnCl_2$, $FeCl_3$, $CuCl_2$, $CaCl_2$, $BaCl_2$ and $AlCl_3$ in five concentrations (0.001, 0.01, 0.1, 1 and 10 mM). For this, 500g of intestinal innards of specimens captured in the state's coast were used. The step enzymatic extraction was performed by maceration and homogenization process. The stage sensitivity was performed according to international scientific standard protocol. The results showed varying degrees of inhibition for the ions: KCl , $ZnCl_2$, $FeCl_3$ and $CuCl_2$. The data obtained by the $CaCl_2$ varied according to the tested concentrations (0.001, 0.01 and 0.1 resulted in inhibition, whereas 1 and 10 mM resulted in increased activity, taking into account the control group 100%). All concentrations of $MnCl_2$ resulted in increased activity, while all of $CuCl_2$ resulted in reduction. The $BaCl_2$ and $AlCl_3$ ions also led to reduced activity, although without statistically significant difference. The results suggest different degrees of relationship in different exposure concentrations, trypsin transforming into a biochemical marker of possible changes to metals.

KEYWORDS: Marine; Fish; Digestive Enzyme.

Natural Resources, Aquidabã, v.4, n.1, Set, Out, Nov, Dez 2013, Jan, Fev, Mar, Abr, Mai, Jun, Jul, Ago 2014.

ISSN 2237-9290

SECTION: Articles
TOPIC: Ictiologia

DOI: 10.6008/SPC2237-9290.2014.001.0002

Vagne de Melo Oliveira

Universidade Federal de Pernambuco, Brasil
<http://lattes.cnpq.br/6160988158330428>
vagne_melo@hotmail.com

Nathalia Albuquerque Roberto

Universidade Federal de Pernambuco, Brasil
<http://lattes.cnpq.br/2901678079706631>
nathalb@yahoo.com.br

Caio Rodrigo Dias Assis

Universidade Federal de Pernambuco, Brasil
<http://lattes.cnpq.br/0018678980235423>
caiodias2@hotmail.com

Ranilson de Souza Bezerra

Universidade Federal de Pernambuco, Brasil
<http://lattes.cnpq.br/2205151409139871>
vagne_melo@hotmail.com

Received: 04/12/2013

Approved: 29/09/2014

Reviewed anonymously in the process of blind peer.

Referencing this:

OLIVEIRA, V. M.; ROBERTO N. A.; ASSIS, C. R. D.; BEZERRA, R. S.. Caracterização parcial de tripsina extraída de vísceras digestivas de *Lutjanus Synagris*: sensibilidade a íons metálicos. *Natural Resources*, Aquidabã, v.4, n.1, p.15-23, 2014. DOI: <http://dx.doi.org/10.6008/SPC2237-9290.2014.001.0002>

INTRODUÇÃO

A produção mundial de pescado (proveniente tanto da pesca extrativa quanto da aquicultura) atingiu aproximadamente 168 milhões de toneladas em 2010. No Brasil, em 2011, a produção pesqueira marinha de peixes foi de 482.335,7t. Dentre as espécies, a produção de *Lutjanus synagris* (Linnaeus, 1758) no Brasil foi de 1.951,3t (BRASIL, 2013). Segundo Manooch e Manson (1984), assim como os demais lutjanídeos, o Ariocó é um recurso pesqueiro importante tanto para a pesca recreativa, quanto para a comercial. No Brasil a espécie é um recurso pesqueiro relevante na pesca artesanal e está entre as dez principais espécies capturadas na pesca de linha, com grande expressividade comercial (REZENDE *et al.*, 2003; KLIPPEL & PERES, 2002 apud. CAVALCANTE *et al.*, 2012).

Essa espécie de peixe possui corpo alongado com um tamanho médio de 36 cm, podendo chegar a 50 cm, coberto por escamas ctenóides, e cabeça caracteristicamente triangular em vista lateral e uma coloração prateada avermelhada, com uma série de estrias longitudinais amareladas (LEITE JUNIOR *et al.*, 2005). O *L. synagris* é encontrado em todo o oceano Atlântico oeste, desde a Carolina do Norte até o sudeste do Brasil, sendo muito abundante nas Antilhas, Panamá e na costa norte da América do Sul.

As enzimas digestivas são enzimas endógenas presentes no trato digestivo e atuam como reservas ou complemento no processo digestivo. As proteases apresentam enorme diversidade bioquímica, sendo facilmente aplicáveis biotecnologicamente e possuindo grande importância comercial, de modo que são amplamente utilizadas nas indústrias de alimento, farmacêutica, de diagnóstico, bem como, na indústria química (KUMAR & TAKAGI, 1999), e, sobretudo, executando complexas funções fisiológicas, atuando significativamente na regulação do metabolismo. A tripsina produzida no pâncreas é um exemplo de enzima proteolítica secretada na forma precursora de tripsinogênio inativo, a qual é convertida em tripsina no duodeno por enteroproteases, além disso, é uma das principais proteinases detectadas no ceco do intestino de peixes, e atualmente, é considerada uma endoprotease de serina que hidrolisa as ligações peptídicas (BEZERRA *et al.*, 2001; MARCUSCHI *et al.*, 2010).

O aumento da produção de resíduos antropogênicos tem acarretado danos ecológicos (TÜRKMEN *et al.*, 2005; ONER *et al.*, 2009), uma vez que muitos deles são, em última instância, depositados nos ecossistemas fluviais (FERNANDES *et al.*, 2007). Os metais pesados são substâncias quimicamente reativas e bioacumuláveis, ou seja, os organismos não são capazes de eliminá-las com facilidade (FARIAS *et al.*, 2007). Este trabalho objetivou extrair e avaliar sensibilidade de uma protease digestiva (tripsina) de *Lutjanus synagris* (Ariocó) através da exposição a diferentes íons metálicos em diferentes molaridades.

METODOLOGIA

Para este ensaio, foram utilizadas vísceras do peixe marinho *Lutjanus synagris* (Ariocó) oriundas do litoral alagoano, através de colônia de pescadores comunitária situada na Ponta Verde, Maceió, Alagoas. Após a evisceração realizada pelos pescadores, 500g de vísceras intestinais foram imediatamente congeladas e conduzidas ao Laboratório de Enzimologia, Departamento de Bioquímica, Centro de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Pernambuco (CCB/UFPE), onde foram armazenadas no -80 para processamentos subsequentes.

Etapas de extração

Para a extração da protease digestiva (tripsina), as vísceras intestinais foram maceradas e homogeneizadas (18 rpm durante 5 minutos, com intervalos de 30 segundos) em tampão Tris-HCl 0,05M pH 7,4 com 0,9% de NaCl (p/v), obtendo-se o extrato bruto enzimático (E.B.E.), utilizado nas análises, na proporção de 1:3 (w/v) (BEZERRA *et al.*, 2005).

Etapas de atividade enzimática

A atividade da tripsina foi determinada utilizando-se 170 µL de tampão Tris-HCl 0,05M pH 7,4, 30µL de extrato enzimático (E.B.E.) e 30µL de BApNA (N-α-benzoil-DL-arginina-p-nitroanilida) como substrato específico. Após o período de incubação de 15 min., as amostras foram lidas no leitor de microplaca com comprimento de onda de 405 nm de absorbância. As análises foram realizadas em triplicatas análises (BEZERRA *et al.*, 2005).

Etapas de sensibilidade enzimática

Para o ensaio de sensibilidade foram utilizados 8 íons: cloreto de manganês ($MnCl_2$), cloreto de potássio (KCl), cloreto de zinco ($ZnCl_2$), cloreto férrico ($FeCl_3$), cloreto de cobre ($CuCl_2$), cloreto de cálcio ($CaCl_2$), cloreto de bário ($BaCl_2$) e cloreto de alumínio ($AlCl_3$), em cinco concentrações molares diferentes (0,001, 0,01, 0,1, 1 e 10 mM).

O teste de sensibilidade foi determinado incubando-se 30µL de extrato enzimático (E.B.E.) com 30µL do íon metálico em suas diferentes molaridades durante 30 minutos e, em seguida, acresceu-se a reação com 110 µL de tampão Tris-HCl 0,05M pH 7,4 e 30µL de BApNA.

Após o período de incubação de 15 min., as amostras foram lidas no leitor de microplaca com comprimento de onda de 405 nm de absorbância. A atividade da enzima na ausência de quaisquer aditivos (íons) foi tomada como 100%. Todas as análises foram realizadas em triplicatas (BEZERRA *et al.*, 2005).

Análise estatística

Os valores médios para os diferentes tratamentos foram comparados utilizando análise de variância com um fator (One-way ANOVA) seguida pelo teste de Tukey. O nível de significância adotado foi de 95% ($p < 0,05$), usando o software de modelagem MicroCal Origin Versão 8.0 (Microcal, Northampton, MA, EUA).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A tripsina (EC, 3.4.21.4) é a principal enzima digestiva intestinal, responsável pela hidrólise de proteínas da dieta (BARKIA *et al.*, 2009). A enzima tripsínica é uma serinoprotease que hidrolisa ligações peptídicas em que as carboxilas são constituídas por resíduos de lisina e arginina (RAO *et al.*, 1998; KLOMKLAO, 2008). As tripsinas de animais marinhos lembram as de mamíferos no seu peso molecular, entre 21 a 30,00 kDa (WANG *et al.*, 2010), possuindo a tilápia nilótica aproximadamente 23,5 kDa (BEZERRA *et al.*, 2005); composição de aminoácidos e sensibilidade a inibidores. Apresenta inibição ou instabilidade em pH abaixo de 5,0 e acima de 11,0 e inibição por diisopropil-fluorofosfato (DFP) e pelo fluoreto fenilmetilsulfonil (PMSF, inibidor de serinoprotease) (MARCUSCHI *et al.*, 2010), inibidor de tripsina de soja (SBTI) e aprotinina. Esta enzima hidrolisa substratos sintéticos como N- α -benzoi-DL-arginina-p-nitroanilida (BAPNA) e tosil-arginina-metil-éster (TAME) (WHITAKER, 1994). São enzimas sensíveis a diversos íons metálicos, tais como Ca^{2+} e Mg^{2+} , sendo inativadas pelos íons de Fe^{2+} , Mn^{2+} , Cu^{2+} , Al^{3+} , Ba^{2+} , Co^{2+} e Zn^{2+} , apresentando temperatura ótima em torno de 35-50°C (ALENCAR *et al.*, 2003; BEZERRA *et al.*, 2005, SOUZA *et al.*, 2006).

Figura 1: Sensibilidade de tripsina de *L. synagris* ao íon de MnCl_2 . ANOVA e teste Tukey a 95% de significância ($p < 0,05$).

Os resultados obtidos para o cloreto de manganês e para o cloreto de potássio estão ilustrados nas figuras 1 e 2. De acordo com os dados obtidos, em relação ao grupo controle (100%), houve um aumento da atividade enzimática de 104.11 ± 0.22 , 105.29 ± 0.35 , 103.6 ± 0.04 , 105.53 ± 0.08 e 105.11 ± 0.11 nas concentrações de 0.001, 0.01, 0.1, 1 e 10 mM do MnCl_2 , respectivamente, como

visualizado na figura 1, porém não apresentando diferença significativa. Para o íons KCl os dados indicaram redução da atividade enzimática na proporção de 97.93 ± 0.00 , 98.65 ± 0.03 , 84.65 ± 0.21 , 88.74 ± 0.00 e de 85.32 ± 0.07 nas concentrações de 0.001, 0.01, 0.1, 1 e 10 mM do metal, respectivamente, como visualizado na figura 2 embora não tenha sido detectada diferença significativa.

Figura 2: Sensibilidade de tripsina de *L. synagris* ao íon de KCl. ANOVA e teste Tukey a 95% de significância ($p < 0,05$).

Os testes também detectaram redução de atividade tanto para os íons de cloreto de zinco quanto para férrico, como ilustrados na figura 3 e 4, nas cinco concentrações testadas. Para os íons de cloreto de zinco, como visualizado na figura 3, os resultados obtidos foram de 85.23 ± 0.03 , 88.23 ± 0.03 , 97.18 ± 0.14 , 97.21 ± 0.07 e de 57.93 ± 0.03 para as concentrações de 0.001, 0.01, 0.1, 1 e 10 mM do metal, respectivamente. Já para os íons do cloreto férrico, as reduções foram na proporção de 93.99 ± 0.05 , 94.80 ± 0.03 , 94.05 ± 0.07 , 91.50 ± 0.02 e de 73.0 ± 0.10 nas concentrações de 0.001, 0.01, 0.1, 1 e 10 mM do metal, respectivamente, como visualizado na figura 4. Segundo teste de Tukey, foi detectado diferença significativa ($p < 0,05$) entre as exposições nas concentrações em relação ao 10 mM tanto do $ZnCl_2$ quanto do $FeCl_3$.

Os resultados obtidos para o $CuCl_2$ foram de 61.62 ± 0.22 , 50.24 ± 0.02 , 68.92 ± 0.13 , 56.35 ± 0.00 e de 48.56 ± 0.06 nas concentrações de 0.001, 0.01, 0.1, 1 e 10 mM do metal, respectivamente, como visualizado na figura 5. Todas as concentrações testadas diferiram estatisticamente de modo significativo do grupo controle 100% ($p < 0,05$). Os dados para os íons $CaCl_2$ foram de 86.64 ± 0.03 , 81.83 ± 0.10 , 86.70 ± 0.02 , 104.02 ± 0.18 e de 156.16 ± 0.13 nas concentrações de 0.001, 0.01, 0.1, 1 e 10 mM do metal, respectivamente, como pode ser observado na figura 6. Todas as concentrações testadas diferiram significativamente em relação a concentração de 10 mM de $CaCl_2$ ($p < 0,05$).

Figura 3: Sensibilidade de tripsina de *L. synagris* ao íon de $ZnCl_2$. ANOVA e teste Tukey a 95% de significância ($p < 0,05$).

Figura 4: Sensibilidade de tripsina de *L. synagris* ao íon de $FeCl_3$. ANOVA e teste Tukey a 95% de significância ($p < 0,05$).

Figura 5: Sensibilidade de tripsina de *L. synagris* ao íon de $CuCl_2$. ANOVA e teste Tukey a 95% de significância ($p < 0,05$).

Figura 6: Sensibilidade de tripsina de *L. synagris* ao íon de CaCl_2 . ANOVA e teste Tukey a 95% de significância ($p < 0,05$).

O BaCl_2 teve redução de atividade em todas as concentrações com os valores de 86.55 ± 0.07 , 95.17 ± 0.08 , 85.44 ± 0.03 , 89.52 ± 0.05 , 87.72 ± 0.03 , mas, apresentou diferença significativa na concentração de 0.1 mM em relação ao controle, as demais concentrações não tiveram diferença, como visualizado na figura 7. O íon AlCl_3 com os resultados de $89,82 \pm 0.08$, 95.77 ± 0.00 , 98.95 ± 0.02 , 101.74 ± 0.06 , 101.74 ± 0.06 , apresentou aumento de atividade em 0.01, 0.001mM e redução nas demais molaridades, todavia, não houve diferença em nenhuma das concentrações, comparadas ao controle 100% e as demais molaridades em suas concentrações testadas, como observado na figura 8.

Figura 7: Sensibilidade de tripsina de *L. synagris* ao íon de BaCl_2 . ANOVA e teste Tukey a 95% de significância ($p < 0,05$).

Figura 8: Sensibilidade de tripsina de *L. synagris* ao íon de AlCl_3 . ANOVA e teste Tukey a 95% de significância ($p < 0,05$).

CONCLUSÕES

Os resultados obtidos sugerem diferentes graus de relação nas diferentes concentrações de exposição, transformando a tripsina deste peixe marinho em um marcador bioquímico de possíveis alterações por elementos metálicos para fins diversos (monitoramento ambiental, emprego industrial, processos cromatográficos, entre outros).

REFERÊNCIAS

- ALENCAR, R. B.; BIONDI, M. M.; PAIVA, P. M. G.; VIEIRA, V. L. A.; CARVALHO JUNIOR, L. B.; BEZERRA, R. S.. Alkaline proteases from digestive tract of four tropical fishes. **Brazilian Journal of Food Technology**, v. 6, n. 2, p. 279–284, 2003.
- BARKIA, A.; BOUGATEF, A.; NASRI, R.; FETOUI, E.; BALTI, R.; NASRI, M.. Trypsin from the viscera of Bogue (*Boops boops*): isolation and characterization. **Fish Physiology and Biochemistry**, v.36, p.893-902, 2009.
- BEZERRA, R. S.; SANTOS, J. F.; PAIVA, P. M. G.; CORREIA, M. T. S.; COELHO, L. C. B. B.; VIEIRA, V. L. A.. Partial purification and characterization of a thermostable trypsin from pyloric caeca of tambaqui (*Colossoma macropomum*). **Journal of Food Biochemistry**, v.25, n.3, p.199-210, 2001.
- BEZERRA, R. S.; LINS, E. J. F.; ALENCAR, R. B.; PAIVA, P. M. G.; CHAVES, M. E. C.; COELHO, L. C. B. B.; CARVALHO JUNIOR, L. B.. Alkaline proteases from intestine of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). **Process Biochemistry**, v.40, n.5, p.1829-1834, 2005.
- BRASIL. **Boletim Estatístico da Pesca e Aquicultura 2011**. Brasília: MPA, 2013.
- CAVALCANTE, L. F. M.; OLIVEIRA M. R.; CHELLAPPA, S.. Aspectos reprodutivos do Ariacó, *Lutjanus synagris* nas águas costeiras do Rio Grande do Norte. **Biota Amazônia**, Macapá, v. 2, n. 1, p. 45-50, 2012.
- FARIAS M. S. S.; LIMA, V. L. A.; DANTAS NETO, J.; LEITE, E. P. F.; LIRA, V. M.; FRANCO, E. S.. Avaliação dos níveis de boro e chumbo na água do rio cabelo – João Pessoa(PA). **Engenharia Ambiental**, Espírito Santo do Pinhal, v.4, n.1, p.24-31, 2007.
- FERNANDES, C.; FONTAÍNHAS-FERNANDES, A.; PEIXOTO, F.; SALGADO, M. A.. Bioaccumulation of heavy metals in *Liza saliens* from the Esmoriz-Paramos coastal lagoon, Portugal. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v.66, p.426-431, 2007.

KUMAR, C. G.; TAKAGI, H.. Microbial alkaline proteases: from a bioindustrial viewpoint. **Biotechnol Adv.**, v.17, p.561-94, 1999.

LEITE JUNIOR, N. O.; MARTINS, A. S.; ARAÚJO, J. N.. **Idade e crescimento de peixes recifais na região central da Zona Econômica Exclusiva entre Salvador(BA) e o Cabo de São Tomé(RJ) (13°S a 22°S)**. In: COSTA, P. A. S.; MARTINS, A. S.; OLAVO, G.. Pesca e potenciais de exploração de recursos vivos na região central da Zona Econômica Exclusiva brasileira. Rio de Janeiro: Museu Nacional, 2005.

MANOOCH, C. S.; MASON, D. L.. Age, growth and mortality of lane snapper from southern Florida. **Northeast Gulf Science**, Beaufort, v.7, n.1, p.109-115, 1985.

MARCUSCHI, M.; ESPÓSITO, T. S.; MACHADO, M. F. M.; HIRATA, I. Y.; MACHADO, M. F. M.; SILVA, M. V.. Purification, characterization and substrate specificity of a trypsin from the Amazonian fish tambaqui (*Colossoma macropomum*). **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v.396, n.3, p.667-673, 2010.

ONER, M.; ATLI, G.; CANLI, M.. Effects of Metal (Ag, Cd, Cr, Cu, Zn) Exposures on Some Enzymatic and Non-Enzymatic Indicators in the Liver of *Oreochromis niloticus*. **Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology**, v.82, n.3, p.317-321, 2009.

RAO, M. B.; TANKSALE, A. M.; GHATGE, M. S.; DESHPANDE, V. V.. Molecular and biotechnological aspects of microbial proteases. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v.62, p.597-635, 1998.

REZENDE, S. M.; FERREIRA, B. P.; FRÉDOU, T.. A pesca de lutjanídeos no Nordeste do Brasil: histórico das pescarias, características das espécies e relevância para o manejo. **Boletim Técnico Científico da CEPENE**, v.11, p.257-270, 2003.

SOUZA, A. A. G.; AMARAL, I.P.G.; ESPÍRITO-SANTO, A.R.; CARVALHO JUNIOR, L. B.; BEZERRA, R. S.. Trypsin-like enzyme from intestine and pyloric caeca of spotted goatfish (*Pseudupeneus maculatus*). **Food Chemistry**, p.1429-1434, 2006.

TÜRKMEN, A.; TÜRKMEN, M.; YALÇIN, T.; AKYURT, I.. Heavy metals in three commercially valuable fish species from Iskenderun Bay, Northern East Mediterranean Sea, Turkey. **Food Chemistry**, v.91, n.1, p.167-172, 2005.

WANG, Q.; GAO, Z. X.; ZHANG, N.; SHI, Y.; XIE, X. L.; CHEN, Q. X.. Purification and Characterization of Trypsin from the Intestine of Hybrid Tilapia (*Oreochromis niloticus* x *O. aureus*). **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.58, p.655-659, 2010.

WHITAKER, J. R.. **Principles of Enzymology for the Food Science**. 2 ed. Marcel Dekker: New York, 1994.