

UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ  
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS  
DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA DE PESCA

ENSAIO PRELIMINAR AO ESTUDO DE CARAC  
TERIZAÇÃO E PROPRIEDADES DE ENZIMAS  
PROTEOLÍTICAS EM HEPATOPÂNCREAS DE  
LAGOSTA JOVEM Panulirus laevicauda  
(Latreille)

Silvana Araújo Saker

Dissertação apresentada ao Departa  
mento de Engenharia de Pesca do Centro de Ciências  
Agrárias da Universidade Federal do Ceará, como  
parte das exigências para obtenção do título de Enge  
nheira de Pesca.

FORTALEZA-CEARÁ

Julho-1982

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação  
Universidade Federal do Ceará  
Biblioteca Universitária  
Gerada automaticamente pelo módulo Catalog, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

---

S152e Saker, Silvana Araújo.

Ensaio preliminar ao estudo de caracterização e propriedades de enzimas proteolíticas em hepatopâncreas de lagosta jovem *Panulirus leevicauda* (Latreille) / Silvana Araújo Saker. – 1982.  
37 f. : il.

Trabalho de Conclusão de Curso (graduação) – Universidade Federal do Ceará, Centro de Ciências Agrárias, Curso de Engenharia de Pesca, Fortaleza, 1982.  
Orientação: Prof. Gustavo Hitzschky Fernandes Vieira.

1. Lagostas. I. Título.

CDD 639.2

---

Prof. Ass. Gustavo Hitzschky F. Vieira  
Professor Orientador

COMISSÃO EXAMINADORA

Prof. Aux. Regine Helena Silva F. Vieira  
Presidente

Prof. Ass. Antônio Renato Soares Casimiro

VISTO

Moisés Almeida de Oliveira  
Chefe do Departamento de Engenharia de Pesca

Francisca Pinheiro Joventino  
Coordenadora do Curso de Engenharia de Pesca

ENSAIO PRELIMINAR AO ESTUDO DE CARACTERIZAÇÃO E PROPRIEDADES DE ENZIMAS PROTEOLÍTICAS EM HEPATOPÂNCREAS DE LAGOSTA JOVEM Panulirus laevicauda (Latreille).

INTRODUÇÃO

As lagostas Panulirus argus (Latreille) e Panulirus laevicauda (Latreille) estão incluídas entre os principais recursos pesqueiros do nordeste brasileiro.

Estes crustáceos têm sido objeto de estudos nos principais países produtores, sob os mais diversos ângulos. No Brasil, que está situado entre os principais exportadores, poucas são as informações sobre a fisiologia e bioquímica desses animais.

Como os demais crustáceos, a lagosta Panulirus laevicauda (Latreille) cresce descontinuamente. Em intervalos determinados pela idade, sexo, alimentação e possivelmente outros fatores ambientais, a lagosta sofre ecdise ou muda (Donahue, 1953).

A muda figura entre as principais transformações que ocorrem nos crustáceos, sendo responsável pelo crescimento e desenvolvimento do animal (Aiken, 1980).

O período de muda é reconhecido como o intervalo crítico do ciclo de vida da lagosta, porque com a carapaça mole, sua susceptibilidade a danos físicos aumenta consideravelmente (Passano, 1960).

O crescimento de crustáceos é restrito ao período da muda. Durante o período de pré-muda, verifica-se um incremento de peso (Skinner, 1962) devido ao

grande armazenamento de água nos sacos pericardiais (Bliss & Boyer, 1964). No dia da ecdise, o animal perde peso, à medida que seu velho exoesqueleto é eliminado.

Os períodos cíclicos de crescimento em crustáceos são acompanhados por modificações periódicas no exoesqueleto, epiderme, tecido sub-epidermal e hepatopâncreas e também por alterações marcantes no sangue e urina (Travis, 1955 b).

A muda periódica do exoesqueleto, durante o crescimento dos artrópodos, parece ser controlada por um ou mais hormônios esteróides, coletivamente referidos como ecdisonas ou ecdisteróides (Scheller & Karlson, 1977 a).

Em paralelo ao ciclo de muda, ocorre uma estocagem e mobilização dos produtos da digestão. O principal órgão envolvido nesta estocagem é o hepatopâncreas (Travis, 1955 a). Logo após a muda, muita gordura e glicogênio são encontrados no hepatopâncreas, ao mesmo tempo que o conteúdo de proteína é atenuado. Nos estágios seguintes, as quantidades dos vários componentes aumentam, sendo a princípio moderado, pois a matéria derivada do alimento ingerido é utilizada para o crescimento e, posteriormente mais acentuado, visto que o crescimento do tegumento recentemente endurecido tem cessado, podendo grande parte do material ingerido ser armazenado (Vonk, 1960).

Durante o início do estágio de pré-muda, reservas orgânicas acumulam-se no hepatopâncreas dos decápodos, na forma de lipídeos (Renaud, 1949). Pouco tempo depois, o animal, pára de se alimentar, ocorrendo a muda e o crescimento do novo tecido. Uma vez na ausência da dieta de esterol, deve-se esperar uma mobilização do "estoque de éster esteril" (Whitney, 1969).

Ao final do ciclo de muda, estas reser

vas são gastas para formar o novo exoesqueleto. O glicogênio e algumas proteínas desaparecem do hepatopâncreas neste momento (Passano, 1960).

No processo metabólico dos crustáceos, o hepatopâncreas desempenha papel central, atuando como armazenador de glicogênio, gordura e cálcio. Nele estão contidas as enzimas responsáveis pelo metabolismo da purina, segregação dos ácidos biliares e muitas outras reações do metabolismo dos crustáceos (Passano, 1960).

Embora os conhecimentos sobre a estocagem de proteína e sua utilização sejam escassos, as proteínas parecem ser o principal componente da reserva orgânica armazenada durante a intermuda. Dessa forma, o crescimento normal dos tecidos é possibilitado nos estágios de pós-muda.

Estudos realizados por Vonk (1960) com o crustáceo Maja squinado demonstraram a presença de pelo menos quatro componentes proteolíticos no hepatopâncreas e suco intestinal: proteinases, carboxipeptidase, aminopeptidase e dipeptidases. A proteinase do Maja pode muito bem ser relacionada com a tripsina dos vertebrados, parecendo estar presente no suco estomacal e no hepatopâncreas como enzima ativada (Vonk, 1960).

As proteinases de um grande número de decápodos têm sido reinvestigadas. O fato de elas se apresentarem do tipo tríptica e catéptica, com pontos ótimos mais elevados que os previamente anunciados, pode ser provavelmente devido ao uso de extratos em vez de suco intestinal (Vonk, 1960).

Mews (1957), estudando o decápodo Eriocheir, verificou que a atividade proteolítica do suco intestinal era maior em animais conservados a 20°C que a 15°C. Trabalhando com a caseína com substrato, os primei...

ros aminoácidos a aparecerem durante a ação proteolítica do suco intestinal foram: a alanina, prolina e leucina.

Em geral, existe em todos os tecidos, durante o período de intermuda, um baixo nível de atividade, presumivelmente refletindo a manutenção e recuperação do metabolismo do animal durante a fase ativa de sua vida (Skinner, 1968).

Em associação com a muda, existe um incremento substancial na síntese de proteína, refletindo-se nos conteúdos de proteínas e enzimas requeridas para a ecdise e o crescimento (Skinner, 1968).

A nível de constituintes orgânicos, as proteínas, incluindo as enzimas e os lipídeos, são os compostos mais susceptíveis a mudanças em relação ao ciclo de muda.

Para a designação dos estágios do ciclo de muda, de acordo com Travis (1955 a), vários métodos foram necessários e dois principais têm sido enfatizados: 1) indicação pelo período de tempo exato, e 2) indicação pelos caracteres morfológicos do esqueleto e tecidos. O primeiro oferece a vantagem de se saber o quanto o animal cresce de uma muda a outra. O segundo método consiste em dividir o ciclo de muda em quatro estágios A, B, C e D segundo Drach (1939). Sua vantagem é a possibilidade de agrupar os animais mais dentro de um mesmo estágio sem precisar fazer referências sobre o intervalo de tempo ao qual tal estágio estende-se.

Ambos os métodos serão usados, visto que eles são suplementares e necessários para uma comparação interespecífica (Travis, 1954).

Os seguintes estágios do ciclo de muda foram determinados para a lagosta Panulirus argus (Latreille) por Travis (1955 a), baseando-se no método original de

Drach (1939).

Estágio A - estágio imediatamente após a muda. O exoesqueleto é completamente mole. O animal não se alimenta. Sua duração é aproximadamente 24 horas.

Estágio B - endurecimento prévio do esqueleto; a carapaça é rígida em algumas regiões, enquanto os branquióstegitos permanecem macios. O animal ainda não se alimenta. Sua duração varia de 1 a 5 ou 6 dias após a muda.

Estágio C - o esqueleto é completamente duro, continuando a engrossar durante uma boa parte do período. É o mais longo período do ciclo de muda, com duração de 7 a 51 dias após a muda. O animal se alimenta. No final do estágio C as camadas membranosas e principais são concluídas. O termo "intermuda animal" será usado para animais com desenvolvimento completo, isto é, de 28 a 35 dias de uma muda a outra.

Estágio D - o futuro esqueleto está sendo construído progressivamente sob o velho que é gradualmente fragmentado pela perda de constituintes minerais e orgânicos. Sua duração é de 10 a 14 dias e o animal não se alimenta. Há um aumento da estocagem de reservas orgânicas e minerais no hepatopâncreas, as quais são mobilizadas quando requeridas por outros tecidos.

O objetivo de nosso trabalho é conhecer as propriedades do sistema proteolítico do hepatopâncreas de lagostas jovens Panulirus laevicauda (Latreille), e observar seu comportamento com relação aos estágios de seu ciclo de muda.



## MATERIAL E MÉTODOS

No presente estudo, utilizamos lagostas jovens da espécie Panulirus laevicauda (Latreille) capturadas na praia do Meireles e do Farol, em Fortaleza-Ceará. As lagostas foram acondicionadas nos aquários do Laboratório de Ciências do Mar com renovação de água e aeração constantes, e de lá retiradas no momento da preparação dos extratos de hepatopâncreas.

Alguns indivíduos em estágio de pré-muda foram isolados dos demais, com a intenção de obtê-los nos estágios A e B. Neste período, o animal torna-se muito vulnerável a danos físicos, carapaça sem resistência, protegendo-se e dificultando sua captura.

A determinação dos estágios do ciclo de muda foi feita pelo método de Drach (1939), citado por Travis (1955 a).

Os ensaios para as determinações e caracterizações do sistema enzimático foram feitos com lagostas no estágio C.

Antes da retirada do hepatopâncreas, foram determinados em cada indivíduo, o comprimento zoológico e o estágio do ciclo de muda.

Em laboratório, o hepatopâncreas era retirado através da remoção da parte superior da carapaça e deixados durante 2 minutos sobre papel de filtro quantitativo Framex, faixa branca, 12,5 cm de diâmetro, a fim de que os fluidos corpóreos fossem absorvidos para não influir no peso do hepatopâncreas.

Nestas condições, os hepatopâncreas foram pesados em balança Mettler P 1200, homogeneizados com

tampão fosfato 0,01M em cloreto de sódio (NaCl) 0,1 M pH 7,0 na proporção de 1:10 (p/V).

Os extratos foram centrifugados a 20.000 x g durante 15 minutos em centrífuga International, modelo HT, à temperatura em torno de 4°C. Os sobrenadantes foram conservados em congelador até o momento de sua utilização, sendo desprezados os precipitados.

Nos extratos, foram determinadas as concentrações de proteína, nitrogênio amino solúvel e atividade proteolítica.

A concentração de proteína foi determinada pelo método do Micro-biureto (Goa, 1953), usando-se como padrão a albumina sérica bovina (Sigma, Figura 1), sendo os resultados expressos em miligrama (mg) de proteína por mililitro (ml).

O teor de nitrogênio amino solúvel foi determinado mediante o método de Yemm & Cocking (1955). A 0,5 ml de amostra adicionou-se 1,0 ml do reagente de ninhidrina, sendo a mistura colocada em banho-maria (100°C) por 15 minutos. Em cada tubo foi adicionado 4,0 ml de etanol a 50%, com agitação. A cor desenvolvida foi lida a 570 nm em espectrofotômetro Varian Techtron modelo 635 K. Calculou-se a concentração de N - amino solúvel por comparação com uma curva padrão da L - Leucina (Merck, Figura 2) e expressa em micrograma ( $\mu$ g) de N - amino solúvel por mililitro (ml).

A atividade proteolítica foi determinada como a capacidade de hidrolizar a caseína.

A reação enzimática desenvolveu-se pela adição de 0,1 ml do extrato a 5,0 ml de caseína (segundo Hammarsten, E. Merck AG Darmstadt) a 1% em tampão fosfato 0,01 M em NaCl 0,1 M pH 7,0. A incubação foi feita a 50°C

durante 60 minutos. Parou-se a reação com 1,0 ml de ácido tricloro acético (TCA) a 40% (Ainouz et alii, 1972). Após 30 minutos de repouso, a mistura foi filtrada em papel de filtro quantitativo Framex, faixa branca, de 12,5 cm de diâmetro, sendo a atividade proteolítica determinada na fração solúvel em TCA e medida pela absorvância em 750 nm em espectrofotômetro Varian Techtron modelo 635 K, depois da reação com o reagente de Folin (Lowry et alii, 1951). O tempo zero ou branco da reação foi obtido pela adição do substrato após ter sido adicionado TCA a 40%. Todos os valores de densidade ótica das amostras foram subtraídos dos valores dos brancos. A unidade de atividade correspondeu a variação de 0,1 de densidade ótica. A atividade proteolítica foi expressa em unidade de atividade (U.A.) por mililitro (ml) e a atividade específica determinada por meio da divisão da atividade proteolítica pela concentração de proteína em miligrama por mililitro.

A determinação do pH ótimo da protease efetuou-se utilizando-se tampão fosfato 0,01 M em cloreto de sódio (NaCl) 0,1 M nos seguintes pHs: 6,0; 7,0; 8,0; 9,0; 10,0; 11,0 e 12,0. O substrato (caseína 1%) usado, foi preparado também nos respectivos pHs. A reação enzimática foi desenvolvida como descrita anteriormente e os resultados foram expressos em unidade de atividade por mililitro.

O tempo e a temperatura ótimos foram determinados mediante a incubação da enzima e substrato em temperaturas de 30, 40 e 50°C, durante períodos de 30, 60, 90 e 120 minutos. A reação enzimática foi semelhante aos demais ensaios e os resultados expressos em unidade de atividade por mililitro.

Para a escolha da concentração de substrato a ser usada, foram feitos experimentos em que a concentração do substrato variou de 10 a 70 mg de caseína, con

servando-se o volume de 0,1 do extrato. A reação enzimática foi idêntica às anteriores e os resultados expressos em unidade de atividade por mililitro.

A termo - estabilidade foi determinada submetendo-se o extrato a temperaturas de 40, 50 e 60°C durante 15, 30 e 60 minutos. Após cada tempo, o extrato era retirado da temperatura e, nele, determinada a atividade enzimática. Os resultados foram expressos em U.A. x ml<sup>-1</sup>, sendo transformados em porcentagens de atividade relativa ao extrato não submetido ao calor, cuja atividade foi considerada 100%.

Para a determinação do tampão e pH de extração foram usados os tampões: acetato nos pHs 4,0 e 5,0; fosfato nos pHs 6,0 e 7,0, e borato nos pHs 8,0; 9,0 e 10,0. Nos sobrenadantes, foram determinadas as atividades proteolíticas e teor de proteína, sendo os resultados expressos em unidade de atividade por mililitro e miligrama de proteína por mililitro, respectivamente. A atividade específica é o quociente da divisão da atividade pela proteína, sendo seus resultados expressos em U.A. x mg Prot.<sup>-1</sup>.

Os extratos de hepatopâncreas de lagostas jovens, preparados com tampão acetato de sódio pH 5,0 na proporção de 1:5 (p/V) foram usados para purificação com sulfato de amônia. O sulfato de amônia sólido foi gradualmente adicionado ao extrato para 20% de saturação e o precipitado foi removido por centrifugação (20.000 x g, 15 minutos, 4°C). O sobrenadante resultante foi usado para as próximas precipitações com 40, 60, 80 e 100% de saturação com (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub> SO<sub>4</sub>. Os precipitados obtidos foram suspensos em tampão fosfato pH 7,0, e dializados contra água destilada e deionizada, durante um período de tempo suficiente para que a água não apresentasse reação positiva com o hidróxido de bário. O conteúdo de proteína e as atividades proteolíticas

foram determinadas em todas as frações. Os resultados obtidos foram expressos em mg de proteína por ml e UA x mg, P<sup>-1</sup> para a proteína e atividade específica, respectivamente.

Após a determinação dos parâmetros de caracterização do sistema enzimático, foram realizados experimentos relativos à atividade proteolítica e ao conteúdo de proteína em lagostas jovens nos diversos estágios de muda.

## RESULTADOS

Na determinação das condições ótimas de ensaio, o extrato de hepatopâncreas foi utilizado como fonte de enzima.

A curva da atividade proteolítica em relação ao pH, usando a caseína 1% como substrato, indica que o máximo de atividade foi alcançado em pH 7,0, sugerindo ser este o pH ótimo para a reação enzimática (Tabela I, Figura 3). Em pH 9,0 observa-se um leve aumento na atividade proteolítica, representando cerca de 84% daquela obtida em pH 7,0.

Inicialmente, pode se observar que a atividade proteolítica é crescente quando há aumento da temperatura de incubação (Tabela II, Figura 4). Na temperatura de 50°C e no tempo de sessenta minutos esta atividade apresentou um incremento percentual mais elevado, quando comparado aos demais, razão pela qual foram escolhidos para os ensaios enzimáticos.

A fim de que a reação enzimática se desenvolvesse na presença de excesso de substrato, foi determinada a relação enzima - substrato. Pela curva obtida ficou estabelecida a relação de 50 mg de substrato (caseína 1%) para 50 mg de proteína por mililitro do extrato, em um volume total de 10 ml (Tabela III, Figura 5).

A estabilidade da enzima em relação à temperatura é mostrada na Tabela IV, Figura 6. Observou-se que somente a 60°C de temperatura a enzima perde marcadamente grande parte de sua atividade.

Nas temperaturas de 40°C e 50°C verificou-se, inicialmente, um aumento de atividade e, a partir de 60 minutos de incubação, a enzima começa a perder sua

atividade.

A Tabela V e Figura 7 mostram a atividade proteolítica específica em relação ao pH de extração, o qual apresentou-se mais eficiente em tampão acetato de sódio pH 5,0, seguindo-se do tampão fosfato pH 6,0 e 7,0.

No processo de purificação do sistema enzimático, observou-se que a fração entre 40 - 60% de saturação com sulfato de amônia foi a que apresentou maior atividade proteolítica específica, seguindo-se das frações 20 - 40% e 60 - 80%. Com o tratamento de sulfato de amônia a 40 - 60% de saturação há um aumento de 5,65 vezes em relação à atividade do extrato bruto, correspondente a 565% havendo uma recuperação de 13,9% (Tabela VI, Figura 8).

Os resultados da atividade proteolítica específica, bem como os teores de proteína e nitrogênio amino solúvel em hepatopâncreas de lagosta jovem Panulirus laevicauda (Latreille), relacionados com o estágio do ciclo de muda, devem ser considerados de caráter preliminar.

O pico máximo de atividade proteolítica específica ocorreu no estágio C, sendo seu valor mínimo observado no estágio D (Tabela VII, Figura 9).

Em relação à classe de comprimento, o máximo de atividade específica foi verificado para os animais pertencentes à classe de 80 a 90 mm (Tabela VIII).

O conteúdo mais elevado de proteína ocorreu no estágio D e o mais baixo no estágio B (Tabela VII). Em relação às classes de comprimento, o máximo foi verificado para indivíduos pertencentes à classe de 100 a 110 mm (Tabela VIII).

O nitrogênio amino solúvel teve sua concentração máxima no estágio C, sendo a mínima observada

## DISCUSSÃO

A primeira tentativa para caracterizar a especificidade das proteases em crustáceos foi feita por Shinoda (1928) que encontrou três enzimas, as quais foram separadas em relação ao seu pH ótimo (Huggins & Munday, 1968).

Mansour - Beck (1932) trabalhando com hepatopâncreas de Maja squinado encontrou uma protease com atividade máxima no pH entre 6,0 a 6,4, uma carboxipeptidase e aminopeptidase com um máximo em pH 8,2 e uma dipeptidase com o máximo de atividade em pH 8,4.

Em trabalhos mais recentes tem-se evidenciado atividade proteolítica máxima em pH que varia de 6,0 a 8,4 (Travis & Gates, 1969; De Villez, 1975; Trelu & Ceccaldi, 1975).

Os resultados reportados na Tabela I, Figura 3, estariam de acordo com a literatura, sendo que o sistema enzimático apresentou dois ótimos de pH, um em 7,0 e outro, com menor intensidade, em pH 9,0. Isto sugere que no hepatopâncreas de lagosta jovem Panulirus laevicauda (Latreille) ocorrem duas proteases capazes de hidrolizar a caseína.

A temperatura ótima de incubação a 50°C (Tabela II, Figura 4) situa-se próxima àquelas encontradas na literatura para organismo marinho, quando o substrato usado foi caseína (Stern & Lockhart, 1953; Croston, 1960; Dabrowski & Glogowski, 1977).

Os resultados referentes a Tabela III, Figura 4, demonstram uma grande atividade entre a enzima e o substrato, uma vez que o nível de saturação de substrato ocorre na razão de 0,1 ml de extrato diluído de 10



vezes para 50 mg de caseína. Estes valores são bem mais significativos do que aqueles encontrados para outros materiais (Vieira, 1976; Ainouz et alii, 1981).

O sistema enzimático apresentou-se bastante estável em relação a sua exposição ao calor. Nas temperaturas de 40°C e 50°C houve uma ativação nos primeiros 30 minutos de aquecimento do extrato, ocorrendo um decréscimo após 45 minutos de aquecimento. Entretanto, na temperatura de 60°C houve um decréscimo crescente em relação ao tempo, atingindo uma perda de 84% da atividade com 60 minutos de exposição do extrato ao calor (Tabela IV, Figura 5). Esta resistência do sistema enzimático ao calor confere grande estabilidade à enzima, podendo-se trabalhar com o extrato preparado com uma certa segurança e sem grandes riscos de inativação.

Dentre os tampões utilizados em diversos pHs, foi o tampão acetato pH 5,0 que melhor se prestou para a extração de proteases em hepatopâncreas de lagosta (Tabela V, Figura 6). Uma grande parte da literatura indica o tampão fosfato pH 7,0 como o ideal para a extração de proteases (Makinodan & Ikeda, 1969; Vieira, 1976; Ainouz et alii, 1981).

Atividade proteolítica máxima ocorrida na fração 40 - 60% de saturação com sulfato de amônia, situa-se no intervalo de purificação para a maioria das enzimas proteolíticas encontrados na literatura consultada (Makinodan & Ikeda, 1969, Travis & Gates, 1969; Beverly & Eitenmiller, 1974). Considerando que esta fração 40 - 60% apresenta uma grande purificação da ordem de 5,65 vezes (565%) em relação ao extrato bruto e uma boa recuperação da ordem de 13,9% da proteína total, pode-se admitir este tratamento com sulfato de amônia como a primeira etapa de purificação para o sistema enzimático encontrado em hepatopâncreas de lagosta jovem Panulirus laevicauda (La

treille).

O comportamento das proteases e de proteínas em relação ao ciclo de muda em animais é variável de espécie a espécie. Segundo Trellu & Ceccaldi (1976) as proteases do Carcinus maenas têm seu máximo de atividade no estágio C, enquanto que no Palaemon serratus a atividade máxima ocorreu nos estágios C e D.

No Callinectes a renovação de proteína atinge o máximo no hepatopâncreas durante o estágio D (Passano, 1960).

Observa-se todavia que há uma tendência de se encontrar maior concentração de proteína no estágio D do ciclo de muda. Os resultados encontrados no presente trabalho estão de acordo com esta tendência, pois o teor de proteína mais elevado situou-se no estágio D. Neste período, o crustáceo inicia sua inatividade, após uma longa fase de atividade verificada no estágio C. Segundo Trellu & Ceccaldi (1976), no estágio D há uma diminuição das atividades enzimáticas, coincidindo com o início da fase de jejum fisiológico do animal que nesse momento começa a requisitar as reservas acumuladas no hepatopâncreas, durante a fase ativa (estágio C), para utilizá-las em seu processo vital. Isto explicaria a maior atividade proteolítica ter ocorrido no estágio C, decrescendo no estágio D (Tabela VII, Figura 9), quando o animal diminui intensamente suas atividades metabólicas e, consequentemente, suas necessidades nutricionais.

O nitrogênio amino solúvel representa um produto catabólico da quebra de proteína e de purina, ocorrendo trocas paralelas ao metabolismo das proteínas, embora seja no estágio D que se encontra em maior concentração (Passano, 1960). Entretanto, no presente trabalho o máximo de concentração ocorreu no estágio C, correspon

## CONCLUSÕES

Embora os resultados referentes a atividade proteolítica, teor de proteína e nitrogênio amino solúvel sejam de caráter preliminar, podemos tirar algumas conclusões sobre estes parâmetros e, com mais propriedade, sobre a caracterização do sistema enzimático extraído do hepatopâncreas de lagosta jovem Panulirus laevis (Latreille).

1. A enzima apresentou um pH ótimo para a caseína em 7,0. No pH 9,0 observou-se cerca de 84% da atividade proteolítica obtida para o pH 7,0.
2. O ótimo de temperatura foi 50°C, e o tempo de incubação da reação foi de 60 minutos.
3. Para a relação enzima-substrato ficou estabelecida a razão de 50 mg de caseína para 50 mg de proteína do extrato, correspondendo a 0,1 ml do mesmo diluído de 10 vezes.
4. O sistema enzimático foi estável às temperaturas de 40 e 50°C, diminuindo na atividade, em torno de 84%, ficando submedida a 60°C por 60 minutos.
5. O pH mais eficiente de extração da enzima foi mostrado em pH 5,0 usando tampão acetato de sódio.
6. A fração correspondente a 40 - 60% de saturação com sulfato de amônia, foi a que apresentou a maior atividade específica, a purificação foi em torno de 5 vezes em relação ao extrato bruto, com uma recuperação de enzima da ordem de 13,9%.
7. A maior atividade específica ocorreu no estágio C de muda e a menor no estágio D.
8. A concentração máxima de proteína no hepatopâncreas foi

observada no estágio D e a mínima no estágio B.

9. A classe de comprimento que apresentou maior atividade específica foi a dos indivíduos entre 80 a 90 mm de comprimento zoológico.
10. A máxima concentração de proteína com relação a classe de comprimento foi apresentada para os indivíduos pertencentes à classe de 100 a 110 mm de comprimento zoológico, e a mínima para aqueles pertencentes à classe de 80 a 90 mm.
11. A concentração máxima de nitrogênio amino solúvel em relação aos estágios do ciclo de muda apresentou-se no estágio C, enquanto a mínima foi verificada no estágio B.

## SUMÁRIO

O propósito do presente trabalho foi determinar as condições ótimas do sistema enzimático proteolítico e as características fundamentais da protease em hepatopâncreas e sua relação com os estágios do ciclo de muda de lagosta jovem Panulirus laevicauda (Latreille).

As lagostas foram coletadas nas praias do Meireles e Farol em Fortaleza-Ceará e colocadas no sistema de aquários do Laboratório de Ciências do Mar, até o momento da preparação dos extratos de hepatopâncreas.

Os estágios do ciclo de muda foram determinados pelo método de Drach (1939) de acordo com Travis (1955 a).

Os ensaios enzimáticos e os conteúdos de proteína foram elaborados com lagostas no estágio C, com exceção, daquelas que fazem referência a estágios do ciclo de muda.

A atividade proteolítica foi fixada através da aptidão de hidrólise da caseína na razão de 50 mg para 50 mg de proteína por mililitro do extrato.

O extrato de hepatopâncreas foi homogeneizado em tampão fosfato 0,01 M em NaCl 0,1 M pH 7,0 na razão de 1:10 (p/V) em banho de gelo e centrifugado por 15 minutos em 20.000 x g a 4°C. O precipitado era desprezado e no sobrenadante determinava-se a atividade proteolítica e o teor de proteína.

A reação enzimática desenvolveu-se pela adição de 0,1 ml do extrato a 5,0 ml de caseína (segundo Hammarsten, E. Merck AG Darmstadt) a 1% em tampão fosfato 0,01 M em NaCl 0,1 M pH 7,0. A incubação foi feita a 50°C

por 60 minutos. Parou-se a reação com 1,0 ml de ácido tri-  
cloro acético (TCA) a 40% (Ainouz et alii, 1972). A leitura  
da absorvância a 750 nm foi feita após a reação  
com o reagente de Folin (Lowry et alii, 1951) em espec-  
trotômetro Varian Techtron modelo 635 K.

O pH ótimo encontrado para a reação foi  
7,0, embora em pH 9,0 possa ser verificado cerca de 84%  
da atividade apresentada em pH 7,0.

A temperatura ótima de reação foi de  
terminada 50°C durante 60 minutos de incubação.

A quantidade de substrato escolhida  
foi 50 mg de caseína para 50 mg de proteína por mililitro  
do extrato.

Somente a 60°C a protease sofre altera-  
ções, perdendo 84% de sua atividade no final de 60 minu-  
tos.

Para a extração da protease o tampão  
que se mostrou mais eficiente foi o tampão acetato em pH  
5,0.

Em caráter preliminar observamos maior  
atividade proteolítica no estágio D, maior concentração  
de proteína no estágio C e concentração de nitrogênio ami-  
no solúvel mais elevada no estágio C.

Com relação ao comprimento do animal,  
a maior atividade foi verificada no intervalo de classe  
de 80 a 90 mm. O teor de proteína máximo foi observado  
para os indivíduos da classe de 100 a 110 mm e a concen-  
tração de nitrogênio amino solúvel mais alta para aqueles  
entre 90 e 100 mm.

## BIBLIOGRAFIA

- AINKEN, D. E. 1980. Molting and Growth. The Biology and Management of Lobsters. Vol. I. Academic Press Inc. 91 - 163.
- AINOUZ, I. L.; XAVIER FILHO, J. & GOMES FILHO, E. 1972. Atividade proteolítica em sementes de Vigna sinensis seridó. Cienc. Cult., 24: 104.
- AINOUZ, I. L.; BENEVIDES, N. B. & FREITAS, A. L. P. 1981. Proteolytic activities in seeds of Vigna unguiculata (L) WALD. Biol. Plant., 23 (2): 133 - 140.
- BEVERLY, A. B. & EITENMILLER, R. 1974. A study of some kinetic properties of partially purified Penaeus setiferus arylamidase. Jour. Food Sci., 39 : 10 - 14.
- BLISS, D. E. & BOYER, J. R. 1964. Environmental Regulation of Growth in the Decapod Crustacean Gecarcinus lateralis. Gen. Comp. Endocrinol., 4 : 15 - 41.
- CROSTON, C. B. 1960. Tryptic enzymes of chinook salmon. Arch. Biochem. Biophys., 89 : 202 - 206.
- DABROWSKI, K. & GLOGOWSKI, J. 1977. Studies on the role of exogenous proteolytic enzymes in digestion process in fish. Hydrobiol., 54(2) 129-134.
- DEVILLEZ, E. J. 1975. Observations on the proteolytic enzymes in the digestive fluid of the barnacle Balanus nubilus. Comp. Biochem. Physiol., 51 A : 471 - 474.
- DONAHUE, J. K. 1953. Studies on ecdysis in the american lobster (Homarus americanus). Maine Dep. Sea Shore Fish., Res. Bull., 2 (13) : 3 - 11.
- DRACH, P. 1939. Mue et cycle d'intermue chez les crustacés décapds. Ann. Inst. Oceanogr., 19 : 103 - 391.

- GATES, B. J. & TRAVIS, J. 1969. Isolation and comparative properties of shrimp trypsin. *Biochem.*, 8 (11) : 4483 - 4489.
- GOA, J. 1953. A micro - biuret method for protein determination. Determination of total protein in cerebrospinal fluid. *Scand. J. Clin. Lab. Invest.*, 5 : 218 - 222.
- HUGGINS, A. K. & MUNDAY, K. A. 1968. Crustacean metabolism. *Adv. Comp. Physiol. Biochem.*, 3 : 271 - 378.
- LOWRY, O. H.; ROSEBROUGH, N. J., FARR, A. L. & RANDALL, R. J. 1951. Protein measurements with the Folin phenol reagent. *Jour. Biol. Chem.*, 193 : 265 - 275.
- MAKINODAN, Y. & IKEDA, S. 1969. Studies on fish muscle protease. *Bull. Japan. Soc. Sci. Fish.*, 35 (8) : 749 - 757.
- MANSOUR-BEK, J. J. 1932. Die proteolytischen enzyme von Maja squinado Latr. *Z. Vergleich. Physiol.*, 17 : 153 - 203.
- MEWS, H. H. 1967. Über die temperaturadaptation der sekretion von verdauungsfermenten und deren hitzeresistenz. *Z. Vergleich. Physiol.*, 40 : 345 - 355.
- PASSANO, L. M. 1960. Molting and its control. In: *The Physiology of Crustacea*. T. H. Waterman, ed. Vol. I. 473 - 536. Academic Press. New York.
- RENAUD, L. 1949. Le cycle des réserves organiques chez les crustacés décapodes. *Ann. Inst. Océanog.*, 24 : 259 - 357.
- SHELLER, K. & KARLSON, P. 1977 a. Effects of ecdysteroids on RNA synthesis of fat body cells of Calliphora vicina. *Jour. Insect. Physiol.*, 23 : 285 - 291.
- SHINODA, O. 1928. Über die eiweisslösenden enzyme im magensalft von Astacus. *Z. Vergleich. Physiol.*, 7 : 323



- SKINNER, D. M. 1962. The structure and metabolism of a crustacean integumentary tissue during a molt cycle. *Biol. Bull.*, 123 : 635 - 647.
- SKINNER, D. M. 1968. Isolation and characterization of ribosomal ribonucleic acid from the crustacean, Ge-  
carcinus lateralis. *Jour. Exp. Zool.*, 169 : 347 - 356
- TRAVIS, D. F. 1954. The molting cycle of the spiny lobster, Panulirus argus Latreille. II. Molting and growth in laboratory - maintained individuals. *Biol. Bull.*, 107 : 433 - 450.
- TRAVIS, D. F. 1955 a. The molting cycle of the spiny lobster, Panulirus argus Latreille. II. Pré-ecdysial histological and histochemical changes in the hepatopancreas and integumental tissues. *Biol. Bull.*, 108 : 88 - 112.
- TRELLU, J. & CECCALDI, H. 1976. Variations des activités enzymatiques de l'hépatopancréas et du muscle de Palaeomon serratus Pennant (crustacé décapode) au cours du cycle d'intermue. *Soc. Biol. Marseille.*, 115 -120.
- VIEIRA, G. H. F. & PRISCO, J. T. 1976. Effects of NaCl salinity on nitrogenous compounds and proteases during germination of Vigna sinensis seeds. *Physiol. Plant.*, 36 : 317 - 320.
- VONK, H. J. 1960. Digestion and metabolism. In: *The Physiology of Crustacea*. T. H. Waterman, ed. Vol. I. 291 - 316. Academic Press. New York.
- WHITNEY, J. O'CONNELL. 1969. Sterols, fatty acids and sterol content in eggs and hepatopancreas of blue crab Callinectes sapidus (Rathbun). *Acta Embryol. Ex-  
perim.*, 111 - 121.

Tabela I: Variação da atividade proteolítica de hepatopâncreas de lagosta jovem Panulirus lae-  
vicauda (Latreille) em função do pH.

pH	AA 750	U.A. x ml <sup>-1</sup>
6	• 385	962
7	• 530	1325
8	• 415	1038
9	• 445	1112
10	• 405	1012
11	• 380	770
12	• 135	338

Tabela II: Variação da atividade proteolítica de hepatopâncreas de lagosta jovem Panulirus laevicauda (Latreille) em função do tempo e temperatura de incubação.

Tempo (min)	Temperatura (°C)		
	30° C	40° C	50° C
	U.A. x ml <sup>-1</sup>	U.A. x ml <sup>-1</sup>	U.A. x ml <sup>-1</sup>
30	238	475	975
60	438	888	1150
90	588	950	1162
120	725	938	1150

Tabela III: Variação da atividade proteolítica de hepatopâncreas de lagosta jovem Panulirus laevicauda (Latreille) em função da concentração do substrato.

concentração do substrato (mg caseína/ml)	U.A. x ml <sup>-1</sup>
10	1250
30	2775
50	3425
70	3650

Tabela IV: Variação percentual de atividade proteolítica no hepatopâncreas de lagosta jovem Panulirus laevicauda (Latreille) em função do tempo e temperatura de aquecimento do extrato.

Tempo (min)	Temperatura (°C)					
	40		50		60	
	U.A.xml <sup>-1</sup>	% At.	U.A.xml <sup>-1</sup>	% At.	U.A.xml <sup>-1</sup>	% At.
0	2500	100	2500	100	1875	100
15	2525	101	2600	104	525	28
30	2525	101	2475	99	325	17
60	2300	92	2325	93	300	16

Tabela V: Variação da atividade proteolítica específica do hepatopâncreas de lagosta jovem Panulirus laevicauda (Latreille) em função do pH da solução de extração.

pH	U.A. x ml <sup>-1</sup>	mg Prot. x ml <sup>-1</sup>	U.A. x mg Prot. <sup>-1</sup>
4	1550	34,3	45,2
5	6600	61,7	107,0
6	6600	85,8	76,9
7	7200	90,9	79,2
8	7500	128,6	58,3
9	7650	111,5	68,6
10	7000	178,4	39,2

Tabela VI: Atividade específica da enzima de hepatopâncreas de lagosta jovem Panulirus laevicauda (Latreille) em relação a sua saturação com sulfato de amônia.

% de sulfato de amônia	U.A. x ml <sup>-1</sup>	mg.Prot.x ml <sup>-1</sup>	U.A.x mg.Prot <sup>-1</sup>	Recuperação %	Vezes de purificação
0	3525	106,3	33,2	100,0	1,0
0 - 20	275	4,1	67,1	3,9	2,0
20 - 40	1425	13,7	104,0	12,9	3,1
40 - 60	2775	14,8	187,5	13,9	5,7
60 - 80	200	2,4	83,3	2,3	2,5
80 - 100	100	2,4	41,7	2,3	1,3

Tabela VII: Variação da atividade proteolítica do hepatopâncreas de lagosta jovem Panulirus laevicauda (Latreille) em relação aos estágios de muda.

Está- gios de Muda	Nº Lagostas Analisadas	U.A. x ml <sup>-1</sup>			mg.Prot x ml <sup>-1</sup>			U.A. x mg.Prot. <sup>-1</sup>		
		Mi	Ma	$\bar{M}$	Mi	Ma	$\bar{M}$	Mi	Ma	$\bar{M}$
A	2	1.500	5.900	3.700	42,9	77,2	60,0	35,0	76,4	55,7
B	3	450	3.250	2.217	22,3	87,5	46,9	20,2	105,3	53,1
C	18	1.550	6.950	4.042	30,9	125,2	59,9	19,7	181,4	76,9
D	6	550	6.650	3.808	51,5	101,2	72,9	9,7	75,2	50,4

Mi = valor mínimo

Ma = valor máximo

$\bar{M}$  = valor médio



Tabela VIII: Variação da atividade proteolítica do hepatopâncreas de lagosta jovem Panulirus laevicauda (Latreille) em relação às classes de comprimento.

Classe de comprimento (mm)	Nº de Lagostas Analisadas	U.A. x ml <sup>-1</sup>			mg.Prot. x ml <sup>-1</sup>			U.A. x mg.Prot. <sup>-1</sup>		
		Mi	Ma	$\bar{M}$	Mi	Ma	$\bar{M}$	Mi	Ma	$\bar{M}$
80 - 90	5	1.600	5.600	3.260	30,9	51,5	39,1	35,9	181,4	89,0
100 - 110	7	1.550	6.700	4.100	39,4	125,2	75,0	19,7	90,4	59,9
120 - 130	6	2.150	6.950	4.625	30,9	118,3	59,7	50,7	150,6	86,6

Mi = valor mínimo

Ma = valor máximo

$\bar{M}$  = valor médio

Tabela IX: Concentração de nitrogênio amino solúvel em hepatopâncreas de lagosta jovem Panulirus laevicauda (Latreille) com relação aos estágios de muda.

Estágios de muda	Nº de Lagostas Analisadas	µg N - amino solúvel/ml		
		Mi	Ma	$\bar{M}$
A	2	2163,8	3945,7	3054,7
B	2	1272,8	2927,4	2100,1
C	6	2513,8	6045,8	4057,1
D	4	2418,2	2959,3	2649,0

Mi = valor mínimo

Ma = valor máximo

$\bar{M}$  = valor médio

Tabela X: Concentração de nitrogênio amino solúvel em he-  
 patopâncreas de lagosta jovem Panulirus laevi-  
cauda (Latreille) em relação às classes de com-  
 primento.

Classe de com- primento (mm)	Nº de lagostas analisadas	µg N - amino solúvel/ml		
		Mi	Ma	$\bar{M}$
70 - 80	4	2418,3	3945,7	3062,7
90 - 100	5	1272,8	6045,8	3786,6
110 - 120	5	2163,8	40730,0	2812,9

Mi - valor mínimo

Ma - valor máximo

$\bar{M}$  - valor médio

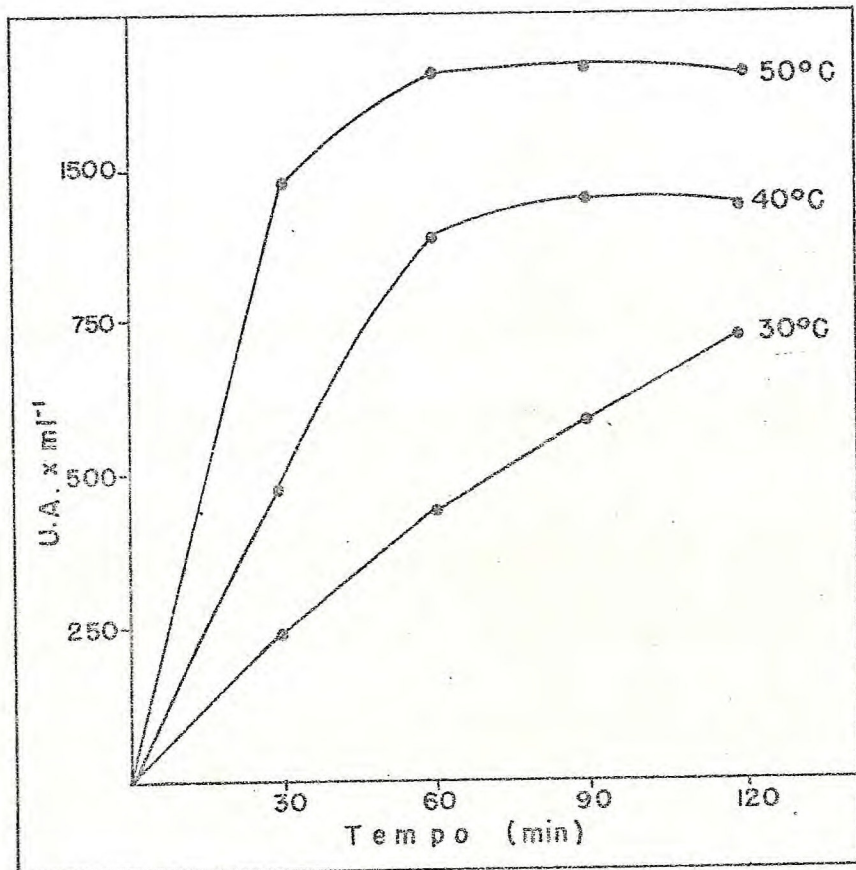


Figura 4 - Variação da atividade proteolítica de hepatopâncreas de lagosta jovem Panulirus laeviscauda ( Latreille. ) em função do tempo e temperatura de incubação.

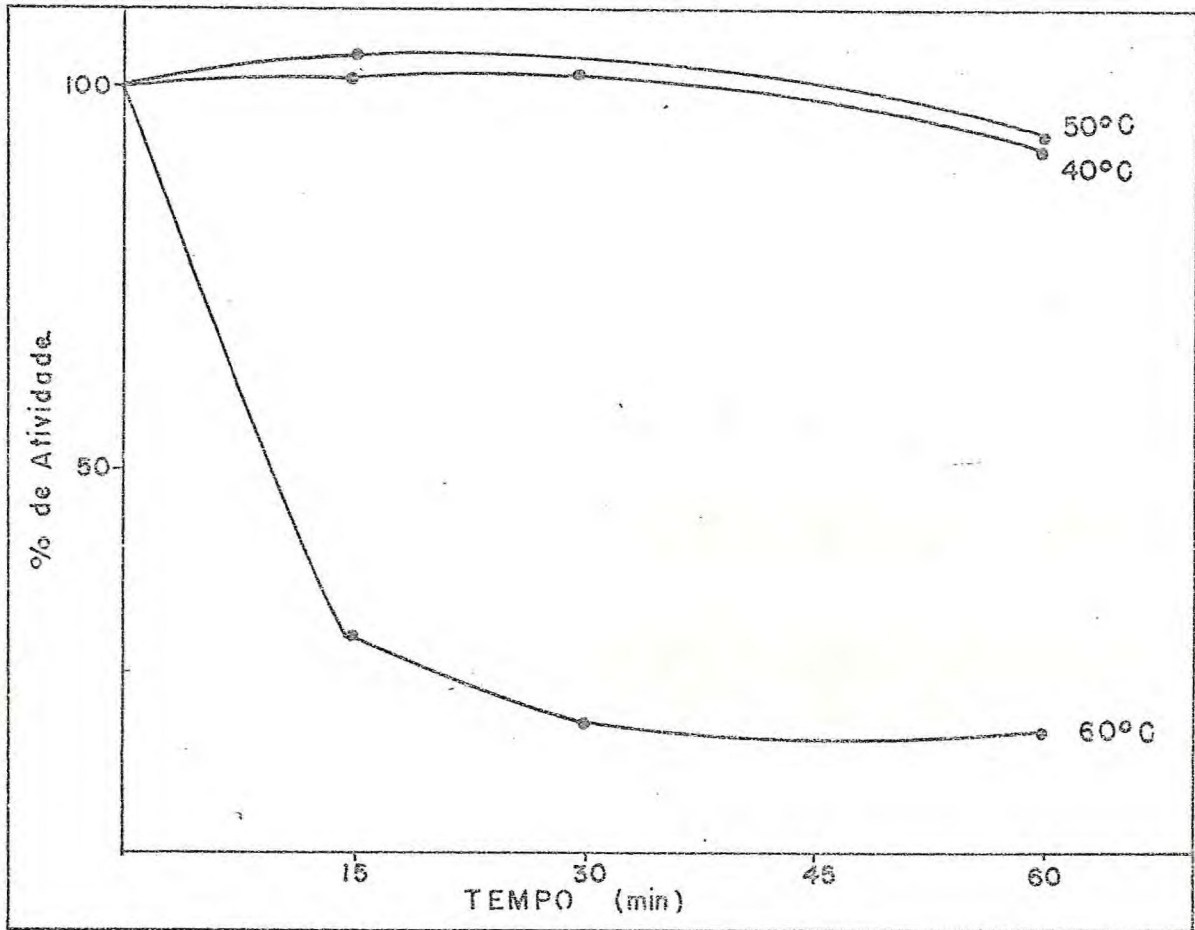


Figura 6 - Variação percentual de atividade proteolítica no hepatopâncreas de lagosta jovem Parulirus laevis (Latreille) em função do tempo e temperatura de aquecimento do extrato.

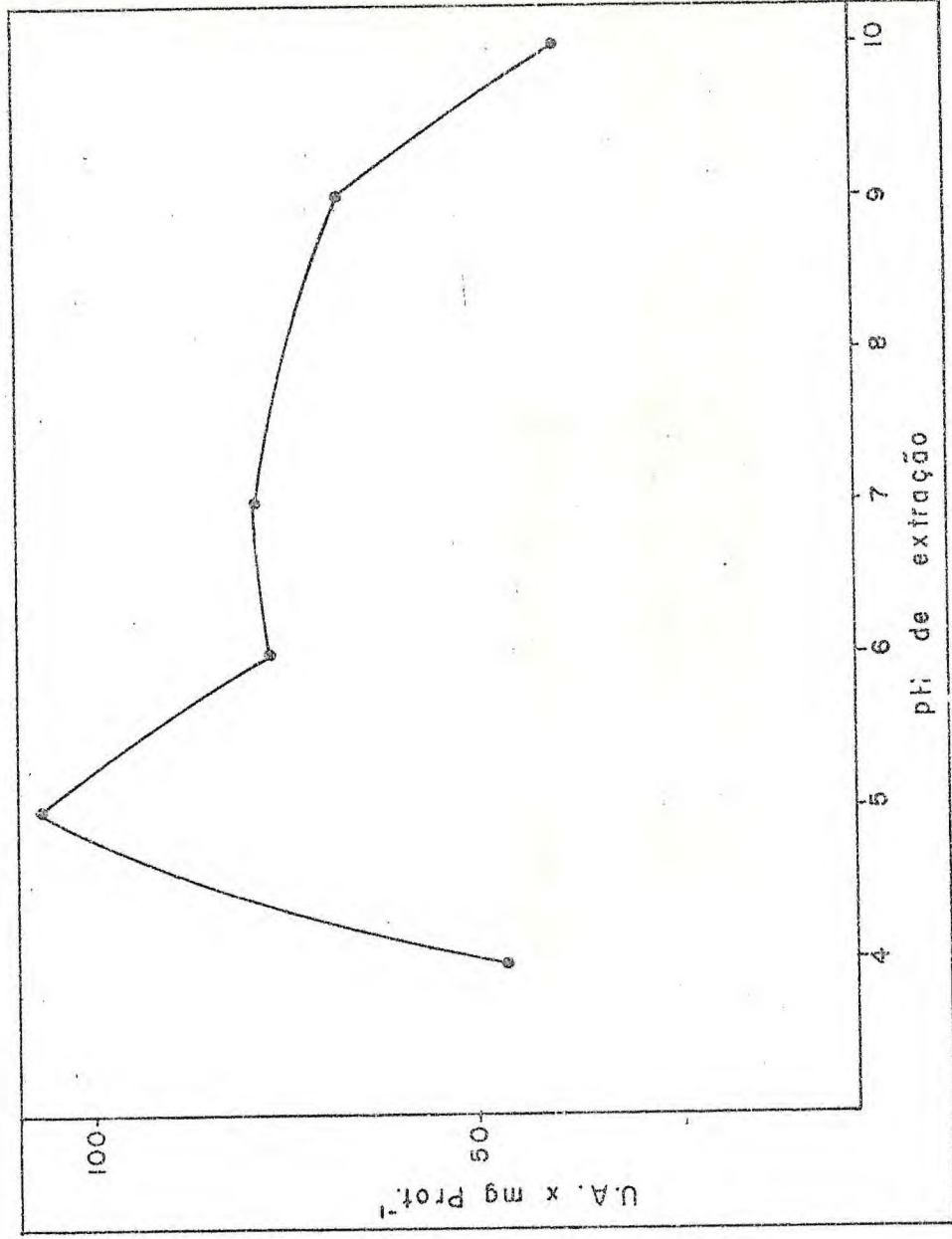


Figura 7 - Variação da atividade proteolítica específica do hepatopân-  
creas de lagosta jovem Faenillirus laevicauda ( Latreille ) ,  
em função do pH da solução de extração.

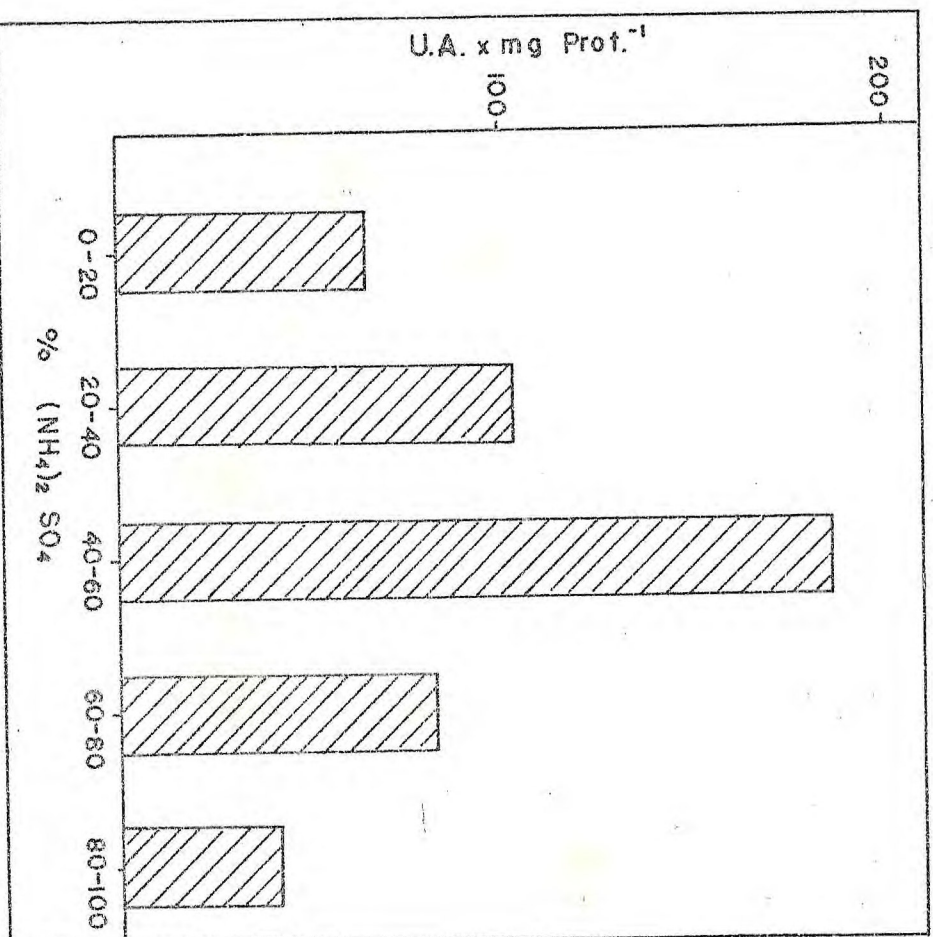


Figura 8 - Atividade específica da enzima de hepato-  
 pâncreas de lagosta jovem Panulirus laxus  
 da ( Latreille ) em relação a sua saturação com sulfato de amônio.