

CARACTERIZAÇÃO DO SISTEMA ENZIMÁTICO DE HEPATOPÂNCREAS
DE LAGOSTA DO GÊNERO *Panulirus* White

SILVANA SAKER-SAMPAIO

DISSERTAÇÃO SUBMETIDA À COORDENAÇÃO DO CURSO DE
PÓS-GRADUAÇÃO EM TECNOLOGIA DE ALIMENTOS, COMO REQUISITO
PARCIAL PARA OBTENÇÃO DO GRAU DE MESTRE

UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ

FORTALEZA - 1989

Esta Dissertação foi submetida como parte dos requisitos necessários à obtenção do Grau de Mestre em Tecnologia de Alimentos, outorgado pela Universidade Federal do Ceará e encontra-se à disposição dos interessados na Biblioteca Central da referida Universidade.

A citação de qualquer trecho desta Dissertação é permitida, desde que seja feita de conformidade com as normas da ética científica.

Silvana Saker-Sampaio

DISSERTAÇÃO APROVADA EM 03 / 02 / 89

Prof. Carlos Brunet Martins
Orientador

Prof. Geraldo Arraes Maia

Prof. Gustavo Hitzschky Fernandes Vieira

Prof. Humberto Ferreira Oriá

Prof. Zuleica Braga de Lima Guedes

Aos meus pais NICOLAU e MARIA DO
CARMO pelo estímulo e confiança
em mim depositados.

As minhas irmãs IZABEL SOPHIA,
ADRIANA e ANDRÉA pelo amor que
nos une.

Ao meu marido ALEXANDRE por tudo
o que ele significa para mim.

A minha filha CLARA e quem mais
vier...

AGRADECIMENTOS

Ao Professor CARLOS BRUNET MARTINS, do Departamento de Tecnologia de Alimentos da Universidade Federal do Ceará, pela orientação, carinho e compreensão durante o desenvolvimento desta pesquisa.

Ao Professor GUSTAVO HITZSCHKY FERNANDES VIEIRA, do Departamento de Engenharia de Pesca da Universidade Federal do Ceará, por todo o incentivo a minha vida profissional e pelo enorme respeito e amizade que tenho por ele.

À Professora IRACEMA LIMA AINOUZ, do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular da Universidade Federal do Ceará, pelas importantes sugestões, grande saber demonstrado quando solicitada no desenvolver desta tese e, principalmente, pelo carinho com que me acolheu em seu laboratório.

Aos Engenheiros de Pesca ALEXANDRE HOLANDA SAMPAIO e GRACE NAZARETH DIOGO THEOPHILO pela importante ajuda para a realização deste trabalho.

Ao Professor ANTÔNIO ADAUTO FONTELES FILHO, do Departamento de Engenharia de Pesca da Universidade Federal do Ceará, pela imprescindível revisão final do texto.

A DEBORAH GARRUTI DOS SANTOS, ELIZABETH MARY CUNHA DA SILVA, LIANA GALVÃO BACURAU, MAGDA MARIA MARINHO ALMEIDA, MATHILDE REBELO NOGUEIRA e NILKA MARIA DE OLIVEIRA que compartilharam comigo o dia-a-dia do curso de mestrado.

A FERNANDO ARAÚJO ABRUNHOSA, FRANCISCO DAS CHAGAS BARROS COSTA, JESPER RODRIGUES SAMPAIO, JOANA D'ARC DE SOUSA COSTA, JOSÉ GIOMÁRIO ARAÚJO BATISTA e MARIA ELISABETH CORREIA DE SOUSA pela valiosa colaboração a mim dispensada.

Aos Professores GERALDO ARRAES MAIA, do Departamento de Tecnologia de Alimentos da Universidade Federal do Ceará, HUMBERTO FERREIRA ORIÁ e ZULEICA BRAGA DE LIMA GUEDES, do Departamento de Farmácia da Universidade Federal do Ceará, pelo apoio e dedicação.

A NORMA BARRETO PERDIGÃO, PATRÍCIA ALVARENGA PORTO LIMA, REGINE HELENA SILVA DOS FERNANDES VIEIRA e VERÔNICA MARIA DE PAULA GURGEL DO AMARAL pela amizade e apoio a mim dedicados.

Aos Professores BENILDO SOUSA CAVADA e JOSÉ TADEU ABREU DE OLIVEIRA do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular da Universidade Federal do Ceará.

Aos Auxiliares de Laboratório FRANCISCO FERREIRA FEITOSA e ZUÍLA COSTA SAMPAIO do Laboratório de Ciências do Mar da Universidade Federal do Ceará.

À RITA DE CARVALHO FEITOSA pelos serviços datilográficos dessa tese.

Ao FUNDO DE INCENTIVO À PESQUISA TÉCNICO-CIENTÍFICA (FIPEC) pelo suporte financeiro para a realização dessa pesquisa.

Finalmente, a todas as pessoas que fazem parte do meu mundo.

SUMÁRIO

Página

<u>LISTA DE TABELAS</u>	
<u>LISTA DE FIGURAS</u>	
RESUMO.....	
ABSTRACT.....	
1 - <u>INTRODUÇÃO</u>	1
2 - <u>REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</u>	9
3 - <u>MATERIAL E MÉTODOS</u>	22
3.1 - <u>Material</u>	22
3.2 - <u>Preparação do pó cetônico</u>	22
3.3 - <u>Preparação do extrato</u>	23
3.4 - <u>Fracionamento por precipitação com sulfato de amônio</u>	23
3.5 - <u>Determinação de proteína</u>	23
3.6 - <u>Determinação da atividade enzimática</u>	24
3.6.1 - <u>Concentração do substrato</u>	24
3.6.2 - <u>Efeito do pH</u>	27
3.6.3 - <u>Efeito da temperatura e do tempo</u>	28
3.6.4 - <u>Termoestabilidade</u>	28
3.6.5 - <u>Ativadores/inibidores</u>	28
3.7 - <u>Unidade de proteinase</u>	29

	Página
3.8 - <u>Cromatografia em Sephadex G-100</u>	29
3.9 - <u>Comparação com enzimas comerciais</u>	30
4 - <u>RESULTADOS E DISCUSSÃO</u>	31
4.1 - <u>Hepatopâncreas/pô cetônico</u>	31
4.2 - <u>Fracionamento com sulfato de amônio</u>	32
4.3 - <u>Efeito do pH</u>	33
4.4 - <u>Efeito da concentração do substrato</u>	44
4.5 - <u>Efeito da temperatura e do tempo</u>	45
4.6 - <u>Termoestabilidade</u>	56
4.7 - <u>Ativadores/inibidores</u>	61
4.8 - <u>Cromatografia em Sephadex G-100</u>	66
4.9 - <u>Comparação com enzimas comerciais</u>	67
5 - <u>CONCLUSÕES</u>	71
6 - <u>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</u>	73

LISTA DE TABELAS

TABELAS	Página
1 Fracionamento do sistema enzimático presente em hepatopâncreas de lagosta do gênero <i>Panulirus</i> White por sulfato de amônio.....	34
2 Variação da atividade proteolítica do sistema enzimático de hepatopâncreas de lagosta do gênero <i>Panulirus</i> White, em função do pH de reação.....	37
3 Variação da atividade proteolítica do sistema enzimático de hepatopâncreas de lagosta do gênero <i>Panulirus</i> White nas frações obtidas pelo fracionamento com sulfato de amônio no intervalo de 20-40 e 40-60% de saturação, em função do pH de reação.....	40
4 Variação da atividade proteolítica do sistema enzimático de hepatopâncreas de lagosta do gênero <i>Panulirus</i> White nas frações obtidas pelo fracionamento com sulfato de amônio no intervalo de 20-40 e 40-60% de saturação, em função da concentração de substrato. O ensaio enzimático foi realizado a 40 e 50°C por 60 minutos.....	46

- 5 Variação da atividade proteolítica do sistema enzimático de hepatopâncreas de lagosta do gênero *Panulirus* White, submetido ao tratamento com sulfato de amônio no intervalo de 20-40% de saturação, em função da temperatura e do tempo de ensaio..... 50
- 6 Variação da atividade proteolítica do sistema enzimático de hepatopâncreas de lagosta do gênero *Panulirus* White, submetido ao tratamento com sulfato de amônio no intervalo de 40-60% de saturação, em função da temperatura e do tempo de ensaio..... 51
- 7 Variação percentual da atividade proteolítica específica do sistema enzimático de hepatopâncreas de lagosta do gênero *Panulirus* White, submetido ao fracionamento com sulfato de amônio nos intervalos de 20-40 e 40-60% de saturação e pré-incubado a 40, 50 e 60°C, em função do tempo..... 57
- 8 Dados relativos a ação de compostos químicos, com concentração igual a 1 mM, sobre a atividade proteolítica específica do sistema enzimático de hepatopâncreas de lagosta do gênero *Panulirus* White, nas frações obtidas pelo fracionamento com sulfato de amônio no intervalo de 20-40 e 40-60% de saturação..... 63

TABELAS

9	Dados comparativos do teor de proteína e atividade proteolítica específica de proteases comerciais e do sistema enzimático de hepatopâncreas de lagosta do gênero <i>Panulirus</i> White.....	69
---	---	----

LISTA DE FIGURAS

FIGURAS		Página
1	Estrutura anatômica dorsal da lagosta do gênero <i>Panulirus</i> White.....	2
2	Estrutura anatômica ventral da lagosta do gênero <i>Panulirus</i> White.....	3
3	Curva padrão da albumina sérica bovina (Sigma) pelo método do microbiureto (GOA, 1953).....	25
4	Curva padrão da tirosina (Merck) pelo método de Folin (LOWRY <u>et al.</u> , 1951).....	26
5	Atividade proteolítica específica do sistema enzimático presente em hepatopâncreas de lagosta do gênero <i>Panulirus</i> White, em função do seu tratamento com sulfato de amônio.....	35
6	Variação da atividade proteolítica específica do sistema enzimático presente em hepatopâncreas de lagosta do gênero <i>Panulirus</i> White no extrato bruto, em função do pH de reação.....	38
7	Variação da atividade proteolítica específica do sistema enzimático presente em hepatopâncreas de lagosta do gênero <i>Panulirus</i> White, submetido ao fracionamento com sulfato de amônio no intervalo de 20-40 (Δ—Δ) e 40-60% (Δ---Δ) de saturação, em função do pH de reação.....	41

- 8 Variação da atividade proteolítica específica do sistema enzimático presente em hepatopâncreas de lagosta do gênero *Panulirus* White, submetido ao fracionamento com sulfato de amônio no intervalo de 20-40 (▲—▲) e 40-60% (▲---▲) de saturação, em função da concentração de substrato. A reação enzimática foi realizada a 40°C por 60 minutos..... 47
- 9 Variação da atividade proteolítica específica do sistema enzimático presente em hepatopâncreas de lagosta do gênero *Panulirus* White, submetido ao fracionamento com sulfato de amônio no intervalo de 20-40 (▲—▲) e 40-60% (▲---▲) de saturação, em função da concentração de substrato. A reação enzimática foi realizada a 50°C por 60 minutos..... 48
- 10 Variação da atividade proteolítica específica do sistema enzimático presente em hepatopâncreas de lagosta do gênero *Panulirus* White, submetido ao fracionamento com sulfato de amônio no intervalo de 20-40% de saturação, em função da temperatura e do tempo de ensaio (40°C ▽—▽; 50°C ▲---▲; 55°C ▲—▲; 60°C ▽---▽)..... 52
- 11 Variação da atividade proteolítica específica do sistema enzimático presente em hepatopâncreas de lagosta do gênero *Panulirus* White, submetido ao fracionamento com sulfato de amônio no intervalo de 40-60% de saturação, em função da temperatura e do tempo de ensaio (40°C ▽—▽; 50°C ▲---▲; 55°C ▲—▲; 60°C ▽---▽)..... 53

FIGURAS

Página

- 12 Variação percentual da atividade proteolítica específica do sistema enzimático presente em hepatopâncreas de lagosta do gênero *Panulirus* White, submetido ao fracionamento com sulfato de amônio no intervalo de 20-40% de saturação e pré-incubação a 40 (Δ — Δ), 50 (Δ -- Δ) e 60°C (\bullet — \bullet), em função do tempo..... 58
- 13 Variação percentual da atividade proteolítica específica do sistema enzimático presente em hepatopâncreas de lagosta do gênero *Panulirus* White, submetido ao fracionamento com sulfato de amônio no intervalo de 40-60% de saturação e pré-incubado a 40 (Δ — Δ), 50 (Δ --- Δ) e 60°C (\bullet — \bullet), em função do tempo..... 59
- 14 Filtração em gel de Sephadex G-100 da fração obtida por precipitação do extrato de hepatopâncreas de lagosta do gênero *Panulirus* White com sulfato de amônio no intervalo de 20-40% de saturação..... 68

RESUMO

O presente trabalho visa a fornecer informações sobre a caracterização do sistema enzimático presente em hepatopâncreas de lagosta do gênero *Panulirus* White.

A reação enzimática desenvolveu-se pela adição de 1,0 ml do extrato bruto da 5,0 ml de hemoglobina bovina (Sigma) a 1% ou caseína (segundo Hammarsten, E. Merck AG Darmstadt) a 1%. A incubação ocorreu a 40°C durante sessenta minutos, finda a qual a reação foi parada com 1,0 ml de ácido tricloroacético a 40%. A leitura da absorbância a 750 nm em espectrofotômetro Bausch & Lomb Spectronic 20 foi feita após a reação com o Folin.

O intervalo de pH ótimo encontrado inicialmente para a reação ficou compreendido entre 7,5 e 9,0. Entretanto, após o fracionamento por precipitação com sulfato de amônio a reação atingiu máxima atividade em pH 8,0.

A melhor temperatura para o desenvolvimento da reação foi alcançada em 50°C com sessenta minutos de incubação.

A quantidade de substrato escolhida foi 50 mg de caseína a 1% para 0,5 ml do extrato encerrando 1 mg de liofilizado em 3 ml de tampão com uma incubação a 50°C durante sessenta minutos.

O sistema enzimático de hepatopâncreas de lagosta submetido a 40°C foi ligeiramente ativado mesmo após decorridos sessenta minutos. As frações 20/40 e 40/60 exibiram uma perda da ordem de 35 a 37% da atividade depois de sessenta minutos a 50°C. Quando a temperatura foi de 60°C com quinze minutos de aquecimento do extrato, a redução da atividade de original foi 77%, em média.

A fração 20/40 experimentou inibição da atividade pela adição de cloreto de mercúrio (HgCl_2), etilenodiamino tetracético (EDTA) e tiosulfato de sódio ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \cdot 5 \text{H}_2\text{O}$) a 1mM. A fração 40/60 foi ativada pelo ácido ascórbico ($\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_6$) e bissulfito de sódio ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$) a 1 mM e inibida pelo cloreto de mercúrio (HgCl_2), cloreto de ferro III ($\text{FeCl}_3 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$), etilenodiaminotetracético (EDTA), cloreto de manganês ($\text{MnCl}_2 \cdot 4 \text{H}_2\text{O}$), ácido cítrico ($\text{H}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7$) e 2-mercaptoctanol ($\text{HSCH}_2\text{CH}_2\text{OH}$) a 1 mM.

O sistema enzimático presente em hepatopâncreas de lagosta do gênero *Panulirus* White exibiu atividade comparável àquela encontrada para três enzimas comerciais A, B e C, embora com a concentração de proteína ainda muito elevada, devido ao estado primário de purificação em que o sistema enzimático de hepatopâncreas se encontra, considerando apenas o fracionamento por precipitação com sulfato de amônio $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$.

Após a eluição do material em coluna de gel Sephadex G-100, a atividade proteolítica específica passa a assumir um valor superior em 1,5 a 2,5 vezes aquele encontrado para as proteases comerciais.

ABSTRACT

The present research work is aimed at supplying information about the characterization of the enzymatic system in the hepatopancreas of lobsters of genus *Panulirus* White.

The enzymatic reaction was developed by adding 1.0 ml of the raw extract at 5.0 ml of bovine hemoglobin (Sigma) at 1%. The incubation occurred at 40°C for sixty minutes, and once it is finished, the reaction was stopped with 1.0 ml of trichloroacetic acid at 40%. The absorbance reading at 750 nm in a Bausch & Lomb Spectronic 20 spectrophotometer was taken after the reaction with the Folin phenolic reagent.

The interval of optimum pH initially established for the reaction ranged from 7.5 to 9.0. However, after the fractionation by precipitation with ammonium sulphate the reaction reached its maximum activity at pH 8.0.

The best temperature to the development of the reaction was attained at 50°C during a sixty minute incubation.

The chosen quantity of substrate was 50mg of caseine at 1% for 0.5ml of the extract containing 1mg of lyophilized in 3.0 ml of buffer with an incubation at 50°C for sixty minutes.

The enzymatic system of the lobster's hepatopancreas under a temperature of 40°C was slightly activated even after sixty minutes had elapsed. The fractions 20/40 and 40/60 showed a loss of about 35 to 37% of activity after sixty minutes at 50°C. When the temperature was 60°C with a fifteen minute heating of the extract there occurred an average

reduction of 77%.

The 20/40 fraction underwent activity inhibition through the addition of mercury chloride (HgCl_2), etilenodiaminotetracetic acid (EDTA) and sodium tiosulphate ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \cdot 5 \text{H}_2\text{O}$) at 1mM. The fraction 40/60 was activated by sodium tiosulphate ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \cdot 5 \text{H}_2\text{O}$), ascorbic acid ($\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_6$) and sodium bisulphite ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$) at 1 mM and inhibited by mercury chloride (HgCl_2), iron chloride III ($\text{FeCl}_3 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$), etilenodiaminotetracetic (EDTA), manganese chloride ($\text{MnCl}_2 \cdot 4 \text{H}_2\text{O}$), citric acid ($\text{H}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7$) and 2-mercaptoethanol ($\text{HSCH}_2\text{CH}_2\text{OH}$) at 1 mM.

The enzymatic system present in the hepatopancreas of lobsters of genus *Panulirus* White displayed activity comparable to the one found for three commercial enzymes A, B and C, despite the still very high protein concentration, owing to the primary state of purification in which is the enzymatic system of hepatopancreas, only considering the fractionation by precipitation with ammonium sulphate - $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$.

After the material elution in a Sephadex G-100 column gel, the specific proteolytic activity assumes a superior value ranging 1.5 to 2.5 times that found for the commercial proteases.

1 - INTRODUÇÃO

As lagostas *Panulirus argus* (Latreille) e *Panulirus laeviscauda* (Latreille) estão incluídas entre os principais recursos pesqueiros do Nordeste brasileiro, sendo uma importante fonte de divisas para o Estado do Ceará (FIGURA 1).

A pesca da lagosta consiste de uma atividade voltada prioritariamente para a exportação, onde somente a carne da cauda possui valor econômico. Por esta razão, no momento da captura, esses animais são descabeçados e seus cefalotórax lançados ao mar. Em consequência desta atitude de caráter pouco racional, substâncias tais como glucosamina e seus cloridratos, quitina, quitosana, astacina e enzimas proteolíticas (GONZALEZ, 1961) são desperdiçadas. Da mesma forma deixam de ser aproveitados produtos como farinha e solúvel protéico, obtidos a partir desta matéria-prima (BASTOS et al., 1971) ou a própria carne, que poderia ser utilizada na preparação de patê (OGAWA & PAULA, 1971). A todos estes prejuízos, soma-se ainda o fato de que os predadores naturais da lagosta são atraídos por causa da grande disponibilidade de alimentos.

No processo metabólico dos crustáceos, o hepatopâncreas (FIGURA 2) 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 envolvidas no metabolismo dos crustáceos (PASSANO, 1960; VAN WEEL, 1974).

Muitos trabalhos têm indicado a presença e utilização de produtos e subprodutos de pescado para elaboração de substâncias de alto valor econômico, entre as quais podem

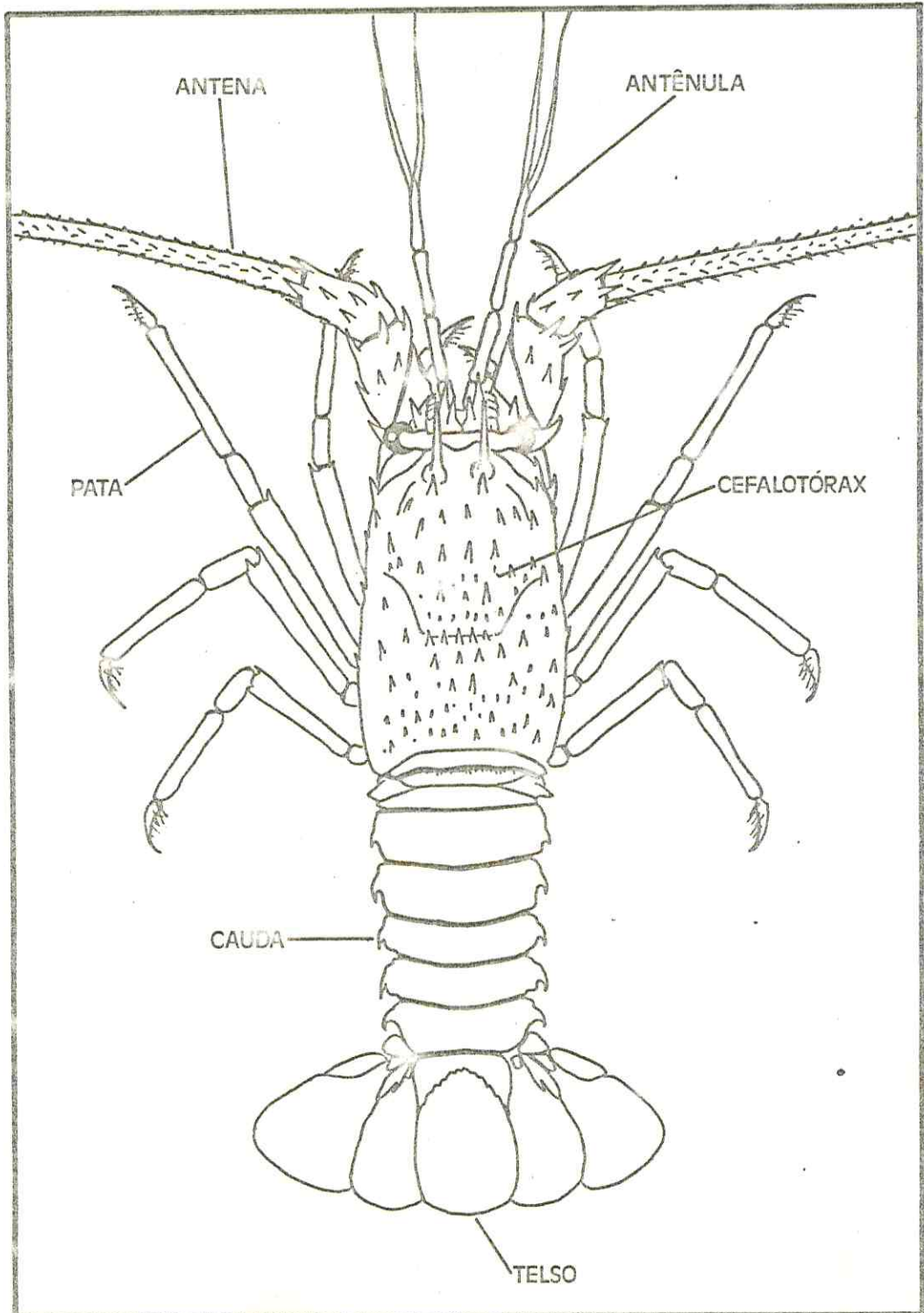


FIGURA 1 - Estrutura anatômica dorsal da lagosta do gênero *Panulirus* White.

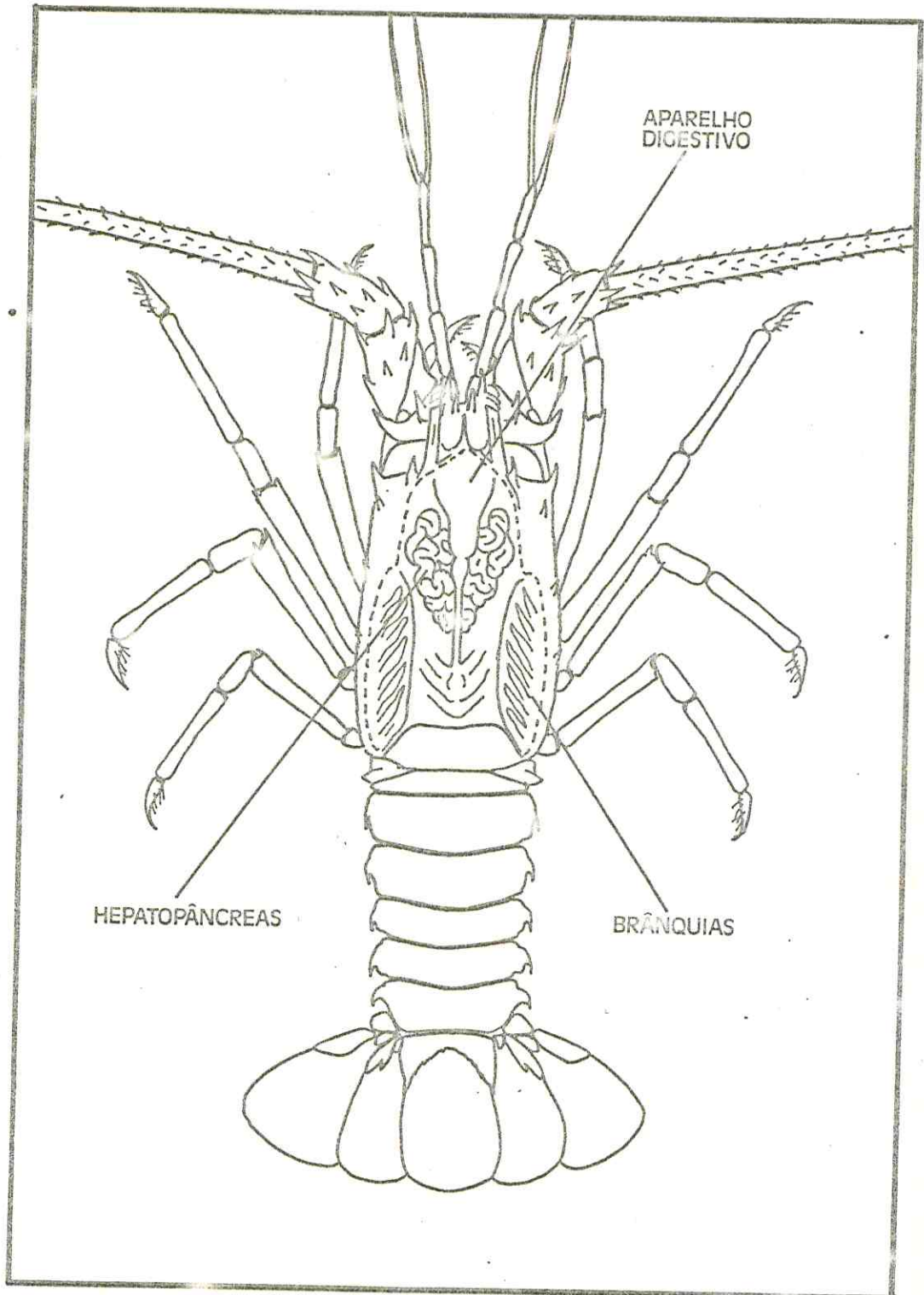


FIGURA 2 - Estrutura anatômica ventral da lagosta do gênero *Panulirus* White.

ser incluídas as enzimas proteolíticas (CROSTON, 1960 e 1965; DEVILLEZ & BUSCHLEN, 1967; GATES & TRAVIS, 1969; TOMÁŠEK et al., 1970; ZWILLING et al., 1975; RIBAS, 1978; COHEN et al., 1981; MURAMATSU & MORITA, 1981; SIMPSON & HAARD, 1984).

No Brasil tem havido pouco empenho no estudo para a elaboração de produtos nobres, apesar do grande potencial existente. A matéria-prima é exportada e, após processada é, em seguida, importada por preços exorbitantes. Outro fato é essa matéria-prima ser processada em território nacional por indústrias estrangeiras, resultando em baixo lucro para o país produtor. Somente em 1985 o Brasil importou 204 toneladas de enzimas, a um custo de US\$ 4,7 milhões, cujo destino principal foi as indústrias alimentícia e farmacêutica (RE VISTA BRASILEIRA DE TECNOLOGIA, 1988).

Os organismos marinhos são produtores de enzimas proteolíticas, as quais, segundo a literatura, parecem ser mais estáveis e de maior atividade do que aquelas extraídas de bovinos (SIEBERT, 1958; PRAHL & NEURATH, 1966; BRADSHAW et al., 1970; REECK & NEURATH, 1972; RIBAS, 1978; TITANI et al., 1983; SIMPSON & HAARD, 1984).

A matéria-prima para extração de proteases existe em abundância no Nordeste brasileiro, podendo ser oriunda de subprodutos de pescado. No caso particular de hepatopâncreas de lagosta como fonte de proteases, sua produção somente em Fortaleza-Ceará foi da ordem de 266 toneladas durante o ano de 1987, considerando que a produção de caudas de lagosta foi estimada em 1.899 toneladas (CACEX - Banco do Brasil), o que correspondeu a 3.798 toneladas de cefalotórax, que representa 2/3 do peso do animal. Isto pode significar perdas de consideráveis quantidades desses compostos biológicos, uma vez que o rendimento médio para obtenção do material liofilizado, a partir do órgão fresco, pode atingir 3%. Assim, tomando esses dados como base, pode-se sugerir que quase 8 toneladas de pó liofilizado deixaram de ser produzidas somente no período em questão.

Enzimas são proteínas mais especializadas, encontra

das nas células vivas, que possuem uma extraordinária ação catalítica, muito superior aos catalisadores sintéticos. As enzimas têm um alto grau de especificidade por seus substratos, aceleram reações químicas específicas sem a formação de produtos colaterais e funcionam em soluções aquosas diluídas em condições muito suaves de temperatura e pH. Poucos catalisadores não-biológicos exibem todas essas propriedades (LEHNINGER, 1985).

As enzimas proteolíticas ou proteases hidrolisam a molécula de proteína nas ligações peptídicas, resultando em compostos de estruturas mais simples. Entre os exemplos clássicos de enzimas pode-se mencionar a pepsina, tripsina e quimiotripsina, todas envolvidas no processo digestivo.

As enzimas proteolíticas são empregadas como auxiliar nos produtos de panificação, no amaciamento de carnes, no processo de clarificação de cervejas, como agente coagulante na manufatura de queijos, no enriquecimento de resíduos alimentares, além de outras aplicações fora da indústria de alimentos (SIMPSON & HAARD, 1984 a).

Na indústria de panificação essas enzimas são de grande valia, considerando que, em geral, o trigo possui uma atividade proteolítica muito reduzida, e a utilização de proteases serve para suplementar tal carência. A atividade da enzima proteolítica é limitada à proteína do glúten, que é responsável pelas propriedades de viscosidade e elasticidade da farinha de trigo.

A aplicação de enzimas proteolíticas também tem sido observada no amaciamento de carnes, embora a distribuição de modo uniforme ainda se constitua em um sério problema, pois a excessiva ação da enzima pode transformar uma porção de carne em uma massa pastosa indesejável. Entretanto, além da importância comercial, o uso de proteases no amaciamento de carnes também exerce um papel relevante quanto ao valor nutricional. Sua ação é responsável pela hidrólise de um ou mais componentes do tecido muscular, em particular o sarcolema - membrana que envolve as fibras musculares.

Um grande número de enzimas proteolíticas de origem vegetal, animal e microbiana funciona de modo eficiente no amaciamento de carnes. A atividade dessas enzimas tem sido estudada química, histológica e sensorialmente e, embora em graus diferentes, sempre é o sarcolema que é hidrolisado. Entre outras proteases a tripsina, papaína, bromelina, ficina e "Rhozyme P-11", obtido de fungos do grupo *Aspergillus flavus-oryzae*, são citadas como importantes para tal fim (MIYADA & TAPPEL, 1956).

Segundo STOREY & WAGNER (1986), na célula microbiana e do tecido animal a proteólise desempenha um papel fundamental em numerosos processos, entre os quais a ativação de enzimas, maturação hormonal, funções de lisossomos, formação de membranas, excreção protéica, diferenciação celular e envelhecimento; entretanto, nos tecidos vegetais, a maioria das pesquisas tem se concentrado em explicar a função das proteases na mobilização das proteínas de reserva.

Um sério problema enfrentado pelas cervejarias é a turvação ocasionada pela proliferação de microrganismos infectantes e, ainda, como resultado de reações químicas ocorridas entre substâncias presentes na cerveja. Com o avanço da moderna tecnologia, a turvação de ordem biológica foi eliminada, porém aquela de caráter não biológico ainda é responsável por grande parte dos problemas na fabricação de cerveja. Essa turvação é o resultado da combinação de polipeptídeos e moléculas de tanino com a formação de partículas facilmente observadas. A utilização de enzimas proteolíticas tem sido um sucesso na prevenção desse tipo de turvação, uma vez que, estas atuam sobre a molécula de proteína (polipeptídeo), cujo tamanho, é consideravelmente maior do que o da molécula de tanino, resultando em um agregado final de proporções mais reduzidas. Assim, o tempo para que o agregado final alcance uma dimensão visível aumentará e, conseqüentemente, o aparecimento da turvação deverá ocorrer de forma mais lenta. A papaína, pepsina, ficina, bromelina, e as proteases bacterianas têm sido usadas na clarificação de cervejas; entretanto, segundo o INFORMATIVO BRASCAN NORDESTE

(1979), a papaína tem sido fornecida ao mercado, praticamente sem concorrentes, considerando que a alternativa para sua substituição seria a pepsina, que além de mais cara, ainda apresenta a desvantagem de produzir um sabor amargo indesejável no processamento de alimentos e na fabricação de cervejas.

A renina, uma enzima proteolítica obtida comercialmente de estômago de bezerro, desempenha um papel importante na produção de queijo. O primeiro passo deste processo envolve a coagulação de leite pela renina, através de hidrólise das ligações peptídicas da caseína. O processo não é tão simples como pode parecer a princípio, e muitas etapas estão envolvidas. Embora outras proteases também sejam capazes de provocar a coagulação do leite, está óbvio que a renina é aquela que fornece o sistema mais eficiente e econômico para a manufatura de queijo.

O uso de proteases para obtenção de hidrolisados protéicos, com o objetivo de enriquecer resíduos alimentares, tem contribuído de modo satisfatório para aumentar o valor nutricional dos produtos destinados à alimentação do homem e de outros animais. Os concentrados protéicos de peixe são largamente aplicados em alimentos, no mundo inteiro, por disporem de proteína animal abundante, barata e sem contra-indicação.

Muitos produtos ricos em proteína de alto valor biológico já se encontram disponíveis no mercado consumidor. Tais produtos são constituídos de proteínas de origem animal e vegetal, previamente tratadas por exoproteases, resultando na hidrólise das cadeias polipeptídicas com liberação de peptídeos e aminoácidos livres que são rapidamente assimilados pelo organismo. Esses produtos podem ser ministrados em todas as faixas etárias para melhorar o desenvolvimento da atividade física e mental.

Além da utilização na indústria alimentícia, as proteases são amplamente empregadas na fabricação de produtos farmacêuticos, cosméticos e nos curtumes para limpeza e tra

tamento de couros e peles.

A grande importância das enzimas proteolíticas, nas mais diversas aplicações e, ainda, a utilização de uma fonte barata e abundante são os argumentos básicos para justificar a pesquisa em questão. Assim, o estudo das características do sistema enzimático presente em hepatopâncreas de lagosta do gênero *Panulirus* White, e a possibilidade de seu aproveitamento para elaboração de um produto nobre, incentivaram a realização deste trabalho.

2 - REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

O uso de enzimas proteolíticas no amaciamento de carnes tem registro há 400 anos, quando os índios mexicanos envolviam pedaços de carnes em folhas de mamoeiro (*Carica papaya*), resultando em uma carne mais tenra, embora a explicação para tal fenômeno fosse inteiramente desconhecida. Somente a partir da década de 50 a papaína, enzima proteolítica encontrada no mamoeiro começou a ser industrializada e comercializada nos Estados Unidos (ESKIN et al., 1971).

A aplicação industrial das enzimas proteolíticas é muito vasta devido à grande importância que elas representam em muitos processos para obtenção de produtos alimentícios e farmacêuticos. Essas enzimas podem ser extraídas de microrganismos, vegetais e animais.

As enzimas proteolíticas ou proteases, também chamadas de peptidases, são todas as enzimas envolvidas na clivagem de proteínas. Este grupo particular de enzimas está relacionado principalmente com a quebra das moléculas de proteína por hidrólise de ligações peptídicas (BENDER & KÉZDY, 1965). Se a hidrólise ocorrer no interior da molécula, elas são chamadas de endopeptidases ou proteinases, as quais podem ser classificadas, de acordo com o sítio ativo envolvido na catálise, em: proteinase serínica como a quimiotripsina, tripsina, elastase e trombina; proteinase cisteínica como papaína, ficina e bromelina; proteinase ácido aspártico e metaloproteinase. Se a molécula de proteína for rompida na porção terminal, tais enzimas são chamadas de exopeptidases. Aqueles específicas para α - NH_2 - terminal são aminopeptidases (que removem unidades de aminoácidos) ou dipeptidil peptidases (que removem sequencialmente dipeptídeos de proteínas e peptídeos). As enzimas atuando na porção α - COOH - ter

minal são carboxipeptidases (que removem unidades de aminoácidos) ou peptidil dipeptidase (que removem sequencialmente dipeptídeos). Dipeptidases convertem dipeptídeos em aminoácidos, enquanto tripeptidases agem sobre tripeptídeos para produzir um dipeptídeo e um aminoácido.

As proteinases endógenas participam de muitas funções vitais na fisiologia do músculo de animais vivos em estado de latência, quando a energia gasta é unicamente para a manutenção do metabolismo basal, de forma idêntica ao que acontece durante os processos de crescimento e desenvolvimento normais, regulando desse modo, o "turnover" de proteína. Todavia, existem controvérsias sobre qual ou quais proteases desempenham a função mais importante nesse processo e sobre o mecanismo pelo qual diferentes proteínas estão envolvidas na transformação e transferência que ocorrem nos músculos. A atividade de proteinases no sistema muscular é afetada por numerosos fatores tais como inibidores endógenos, nutrição, idade cronológica, sistemas nervoso e endócrino e diferentes condições patológicas do animal (ASGHAR & BHATTI, 1987).

Um número substancial de produtos farmacêuticos e bioquímicos podem ser derivados de tecidos e órgãos de peixe, entre os quais se encontram ácidos nucléicos, nucleosídeos, protaminas, insulina, cortisona, sais biliares e enzimas proteolíticas (WINDSOR & BARLOW, 1981).

Está comprovado há muito tempo que extratos aquosos de vários tecidos animais como rim, fígado e baço exibem atividade proteolítica, cuja responsável é uma enzima intracelular denominada catepsina, que atua em proteínas ou em substratos sintéticos de proteinases bem definidas em pH ácido (TALLAN *et al.*, 1952; DE LA HABA *et al.*, 1959; WOJTOWICZ & ODENSE, 1972).

MYCEK (1970) encontrou que as catepsinas A e B exibem efeito proteolítico máximo em valores de pH entre 4,0 - 5,0, ao passo que as catepsinas D e E são mais ativas na faixa de pH compreendida entre 2,5 e 3,5. Dentre os tipos conhecidos, a catepsina C, também chamada de dipeptidil

transferase, tem sido a mais extensivamente estudada.

HUANG & TAPPEL (1971) purificaram parcialmente as catepsinas C e D e encontraram que a primeira aumenta a extensão da proteólise, começada pela catepsina D. De acordo com as determinações de peso molecular dos produtos de digestão é possível observar que a protease catepsina D inicia a hidrólise da proteína produzindo fragmentos de peptídeos que podem ser digeridos, em seguida, pela peptidase catepsina C - inativa contra moléculas de proteínas intatas.

Em tecidos frescos de peixes marinhos pertencentes a família dos gadídeos, SIEBERT (1958) constatou atividade catéptica 10 vezes maior que aquela detectada em músculo de mamíferos (rato, boi, porco ou coelho). Para o autor, não existe nenhuma indicação da presença de outras proteinases com pH ótimo próximo da neutralidade.

A maior parte das informações disponíveis sobre enzimas catépticas tem sido obtida a partir de investigações em órgãos como o pâncreas, rim e fígado, e somente pouca atenção tem sido dispensada para aquelas de origem muscular, talvez pelo fato dessas últimas exibirem uma atividade menor. GRONINGER JR. (1964) purificou a proteinase de músculo de albacora, *Thunnus alalunga* a qual foi similar à catepsina E. As catepsinas de músculo têm sido purificadas de animais como porco (PARRISH JR. & BAILEY, 1966), bovino (PARRISH JR. & BAILEY, 1967) e galinha (MARTINS & WHITAKER, 1968). Em todos os casos essas catepsinas parecem ser similares à catepsina D. ESKIN et al. (1971) e ASGHAR & BHATTI (1987) concordam que as proteinases endógenas desempenham um importante papel durante o período pós-morte, na conversão do músculo em carne comestível.

TING et al. (1968) estudaram as catepsinas presentes em músculo de salmão *Oncorhynchus tshawytscha* tendo encontrado que em pH 3,7 a hidrólise da hemoglobina era máxima e nos pHs 7,0 e 8,5 também observou-se atividade catepsínica, embora em menor grau.

Em músculo de camarão *Penaeus setiferus*, EITENMILLER

(1974) detectou atividade enzimática característica de catepsina D e ausência dos tipos A, B e C.

A catepsina de músculo de bacalhau exibe índices máximos de atividade em pH igual a 4,2 (WOJTOWICZ & ODENSE; 1970). SAKAI & MATSUMOTO (1981) encontraram elevada atividade de proteolítica com máximo em pH 3,1 e a designaram como uma proteinase do tipo catepsina D, presente em músculo de lula *Ommastrephes sloani pacificus*.

LEBLANC & GILL (1982) sugerem que as catepsinas D e E são os maiores componentes proteolíticos encontrados em músculo de lula *Loligo pealei* e *Illex illecebrosus*, respectivamente.

As proteinases presentes em músculo de doze espécies de peixe foram investigadas por MAKINODAN & IKEDA (1969). Dois tipos foram encontrados no material muscular analisado, um com atividade em pH ácido e outro na faixa alcalina. Todas as espécies estudadas exibiram atividade na faixa ácida, ao passo que proteinase alcalina foi detectada nos peixes de músculo branco, exceto o bacalhau, enquanto que nos de músculo vermelho como *Thunnus alalunga*, *Auxis tapeinosoma*, *Scomber japonicus*, *Sardinops melamosticta*, *Seriola quinqueradiata*, *Trachurus japonicus*, a atividade foi muito reduzida ou inexistente.

LIN et al. (1980) encontraram atividade de catepsina D em tecido muscular e renal de corvina, cujas características de termoestabilidade foram consideradas razoáveis.

As enzimas proteolíticas do fluido sarcoplasmático da pescada *Merluccius productus* foram estudadas por ERICKSON et al. (1983) para determinar quais proteases poderiam estar envolvidas com as alterações de textura associadas a esta espécie, e os resultados foram comparados com aqueles obtidos para o bacalhau *Gadus macrocephalus*, um peixe de textura firme. A pescada exibiu atividade enzimática similar à da catepsina B e a atividade de catepsina C foi superior à do bacalhau. Nos casos onde a atividade enzimática foi maior em uma espécie do que na outra, uma ou ambas as razões podem

estar implicadas: (a) um incremento no número de lisossomos presentes no tecido, ou (b) uma intensificação na fragilidade da membrana lisossomal, ambas aumentando as enzimas lisossomais liberadas no fluido muscular.

Vários pesquisadores têm investigado a presença de atividade proteolítica e sua extensão em organismos planctônicos, relacionando-a com processos metabólicos vitais, além de observarem sua aplicação em produtos para consumo humano.

SAMAIN et al. (1977) verificaram atividade trípica em zooplâncton. CORREA et al. (s.d.) estudaram proteases de limo aquático *Blastocladia emersonii* em relação ao ciclo de vida, tendo encontrado atividade aminopeptidase presente em todos os estágios, sem exibir grandes variações em seu nível ao longo do tempo, e duas proteases caseinolíticas. MAYZAUD & MAYZAUD (1981) detectaram atividade de tripsina em copépodos, embora nenhuma atividade quimiotrípica tenha sido registrada. A protease acídica foi considerada como a mistura de catepsinas A e B, possivelmente.

OLALLA et al. (1978) purificaram proteases alcalinas de larvas de *Artemia salina*, e HARA et al. (1984) aquelas presentes em rotífero *Brachionus plicatilis*, cujos pesos moleculares foram considerados extremamente elevados quando comparados com o peso molecular de muitas tripsinas de mamíferos e enzimas trípicas de crustáceos.

Para HEAD & CONOVER (1983) a indução da enzima digestiva em *Calanus hyperboreus* parece ser um processo não específico. A alimentação estimula a síntese enzimática de modo diferente de acordo com o estágio fisiológico do indivíduo.

A protease bacteriana do *Bacillus subtilis* foi utilizada para a solubilização do concentrado protéico de peixe (FPC), que é tido como uma fonte de proteína de alto valor biológico, embora esse produto, julgado altamente desnaturado, possua propriedades funcionais consideradas pobres para justificar sua incorporação em sistemas alimentícios, pois além de não ser prontamente solúvel ou dispersível, ainda exibe propriedades insuficientes de hidratação e intumescên

cia. A interação da enzima e do FPC, por adsorção, provoca a solubilização da proteína insolúvel, e em seguida, a enzima livre pode ser removida com pouca ou nenhuma diferença na produção de proteína solúvel (ARCHER et al., 1973). O mesmo procedimento tem sido utilizado por BERTULLO (1986) usando uma exoprotease da levedura *Hansenula montevideo*.

TENUTA-FILHO & ZUCAS (1987) sugerem que a proteína do resíduo industrial de cefalotórax de camarão é passível de uso na alimentação animal e, inclusive, humana. Embora tenha sido considerada de boa qualidade sob o ponto de vista nutricional, está comprovado que o teor de aminoácidos essenciais presente nessa proteína é mais baixo do que aquele registrado para a caseína e para a proteína padrão da FAO/OMS, principalmente com respeito aos níveis de triptofano e lisina.

A atividade proteolítica de mais de cinquenta espécies de invertebrados marinhos pertencentes a vários grupos sistemáticos foi investigada por KOZLOVSKAYA & VASKOVSKY (1970). Pelos dados revelados pode-se observar que as classes Asteroidea, Crustacea, Polychaeta, Sipunculidea, Loricata e Cephalopoda exibem atividade proteolítica bastante elevada, ao passo que outras classes possuem atividade insignificante. Bivalvia e Echinoidea não apresentaram atividade. Entretanto, segundo MAUGLE et al. (1982 a), alguma atividade pepsínica foi observada no molusco bivalve *Venerupis philippinarum*, enquanto HOLZMAN et al. (1982) evidenciaram a presença de um zimógeno tipo tripsinogênio em ceco pilórico da estrela-do-mar *Pisaster ochraceus*, similar ao encontrado no pâncreas dos vertebrados. Em suco gástrico de polvo, MORISHITA (1978) encontrou quatro componentes proteolíticos, três dos quais com propriedades semelhantes à carboxipeptidase A e o outro julgado uma proteinase tipo a quimiotripsina A.

TOGASAWA et al. (1959) fizeram a extração da proteinase presente em ceco pilórico de bonito, *Katsuwonus pelamis* e observaram que após o procedimento de obtenção sob forma cristalizada, a enzima apresentou atividade 2% maior, com

atividade específica 24 vezes superior a da solução original.

CROSTON (1960) estudou enzimas tripticas em ceco pilórico de salmão *Oncorhynchus tshawytscha* cujas características são semelhantes à tripsina e quimiotripsina dos mamíferos. Ambas são estabilizadas por íons de cálcio e inibidas pelo inibidor de tripsina presente na soja; entretanto, as enzimas de peixe são inativadas em soluções ácidas, ao passo que as de mamíferos são estáveis.

As enzimas encontradas em ceco pilórico de salmão, na maioria dos casos, são bastante semelhantes à tripsina e quimiotripsina dos mamíferos com relação às características físico-químicas e as propriedades funcionais, dentre as quais estão incluídos os padrões de eluição, o comportamento eletroforético e os efeitos do inibidor de tripsina presente na soja (CROSTON, 1965).

MURAKAMI & NODA (1981) encontraram três proteinases alcalinas em ceco pilórico de sardinha, todas pertencentes ao grupo das proteases serínicas. Embora essas enzimas de peixe possuam propriedades comuns em relação à tripsina e quimiotripsina de origem bovina, elas diferem quanto ao pH ótimo, pH de estabilidade, carga líquida e propriedades imunológicas.

Para avaliar a estabilidade das proteases de ceco pilórico e estômago de sardinha, NODA et al. (1982) utilizaram cloreto de sódio com concentração variando de 0 a 25% e encontraram que as proteases alcalinas I, II e III foram fortemente inibidas a proporção que maior quantidade de NaCl era adicionada ao meio de reação.

PRAHL & NEURATH (1966) investigaram as enzimas pancreáticas do *Squalus acanthias* e encontraram que provavelmente só existe quimiotripsinogênio entre os componentes cationicos, ao contrário de mamíferos, onde o tripsinogênio ocorre na fração aniônica e parece ter caráter mais ácido do que básico. Embora de diferentes períodos evolutivos BRADSHAW et al. (1970) também encontraram semelhanças signi

ficativas entre o tripsinogênio do "dogfish" *Squalus acanthias* e aquele de origem bovina.

O intestino do peixe de água doce *Etroplus suratensis* foi considerado uma fonte promissora de proteinase alcalina com grande estabilidade entre pH 6,0 e 8,5, não sendo uma enzima sulfidril. Com um rendimento aproximado de 20%, ela não requer íons metálicos para sua ativação e é inibida pelo inibidor de tripsina presente na soja (SUNDARAM & SARMA, 1960).

O tripsinogênio de origem pancreática do peixe pulmonado *Protopterus aethiopicus* foi purificado e caracterizado por REECK & NEURATH (1972) quanto ao peso molecular, composição de aminoácidos e compostos ativadores, cujos resultados possibilitaram afirmar que as propriedades funcionais da tripsina dessa espécie de peixe e a de origem bovina são semelhantes. Em pâncreas de peixe *Parasilurus asotus*, YOSHINAKA et al. (1983) encontraram tripsina em forma ativa, sendo os zimógenos ativados autocataliticamente, ao nível máximo, quando incubados em pH 8,0 a 4°C durante 4 dias na presença de Ca^{++} .

A tripsina, quimiotripsina e elastase do pâncreas da carpa (*Cyprinus carpio*) têm peso molecular aproximado de 25.000 e a carboxipeptidase B, 34.000, não sendo estáveis em pHs baixos, embora conservem suas atividades em pH neutro na presença de Ca^{++} . Essas proteases possuem características que revelam alto grau de semelhança com as enzimas dos mamíferos, embora algumas diferenças tenham sido observadas (COHEN et al., 1981). COHEN et al. (1981 a) citaram, dentre outras, as seguintes diferenças: (1) a atividade catalítica da tripsina e quimiotripsina sobre certos substratos é elevada em comparação com as enzimas dos mamíferos, provavelmente resultante de alterações estruturais menos importantes nas proximidades do sítio catalítico; (2) a tripsina da carpa interage com os sítios de ligações da quimiotripsina de vários inibidores, propriedade que pode resultar de algumas diferenças no sítio de ligação da tripsina; e (3) o padrão de inibição das elastases da carpa e de porco parece ligei

ramente diferente.

JÓNÁS et al. (1983) classificaram as enzimas proteolíticas digestivas dos peixes *Silurus glanis*, *Hypophthalmichthys molitrix* e *Cyprinus carpio* como proteinases serínicas em sua maioria.

As enzimas proteolíticas participam na utilização das proteínas, conseqüentemente elas afetam diretamente o crescimento de um organismo. Os processos digestivos em peixes são pouco conhecidos e isto pode ser uma das razões para as dificuldades encontradas quando se trata da alimentação de pescado (DABROWSKI & GLOGOWSKI, 1977).

A atividade proteolítica dos extratos brutos de vários órgãos do trato digestivo do peixe *Chanos chanos*, divididos em dois grupos de acordo com a dieta, foi investigada por BENITEZ & TIRO (1982). Em ambos os grupos, alta atividade proteolítica ocorreu em ceco pilórico, intestino e pâncreas, significativa atividade no esôfago, pouca no fígado e nenhuma no órgão epibrânquial e estômagos cardíaco e pilórico. Atividade quimiotríptica foi detectada em extratos de pâncreas, intestino e ceco pilórico de ambos os grupos, contudo atividade trípica ocorreu somente no grupo de peixes alimentado com alga unicelular.

Um estudo das proteases de vários crustáceos decápodos, separados de acordo com o regime alimentar e desenvolvido por SATHER (1969) demonstrou que os omnívoros *Metapogonopsys messor* e *Procambarus clarkii* apresentaram maior atividade proteolítica do que os carnívoros *Podophthalmus vigil*, *Panulirus japonicus* e *Portunus sanguinolentus*. Para HOFER (1979) as proteases são as enzimas digestivas mais importantes, não somente nos animais carnívoros mas também nos omnívoros e herbívoros. Seus estudos resultaram em uma contradição, quando o peixe omnívoro *Rutilus rutilus* alimentado com uma ração com 13,6% de componentes de origem animal apresentou atividade 2 vezes maior que o carnívoro *Scardinius erythrophthalmus*, cuja dieta continha 45% de componentes de origem animal, partindo da premissa de que a atividade proteolítica é muito maior em peixes predatórios do que em es

pêcies omnívoras (VONK apud HOFER, 1978).

MAUGLE et al. (1982) estudaram as características das enzimas digestivas de camarão *Penaeus japonicus* alimentado com uma ração desidratada contendo 60% de proteína. Nos extratos de hepatopâncreas não foi detectada atividade pepsínica, ao passo que uma estável atividade proteolítica foi observada entre pH 7,0 e 8,5.

O grande interesse demonstrado por sistemas enzimáticos presentes em organismos marinhos parece estar baseado em dois aspectos fundamentais: (1) conhecer mais profundamente a fisiologia e bioquímica da espécie, facilitando o entendimento de sua biologia, e (2) avaliar a viabilidade de uma extração rentável com o objetivo de aplicá-la nos mais diversos ramos industriais.

As enzimas digestivas dos crustáceos e outros invertebrados apresentam muitas semelhanças quando comparadas com aquelas dos vertebrados, exceto pela ausência de enzimas do tipo pepsínica (VONK, 1960). Entretanto, muitos organismos marinhos exibem elevada atividade proteolítica na faixa de pH ácido, quase sempre atribuída a uma enzima com características de catepsina. Embora de ocorrência muito rara, LEE et al. (1980) indicaram a presença de significativa atividade enzimática, inclusive de pepsina em extrato de hepatopâncreas de camarão de água-doce *Macrobrachium rosenbergii*. Uma enzima digestiva com pH ótimo compreendido entre 1,8 e 2,3 também foi encontrada em peixe carnívoro *Silurus glanis*. Esta enzima foi considerada análoga a pepsina extraída de sistemas digestivos de organismos superiores (JÓNÁS et al., 1983). NODA & MURAKAMI (1981) indicaram a presença de duas proteínas ácidas isoladas do estômago da sardinha similares à pepsina dos mamíferos e à proteinases ácidas de origem microbiana em relação à estrutura do sítio ativo, que possui dois grupos carboxila, embora sejam distintas com respeito ao número de propriedades moleculares e enzimática. Em hepatopâncreas de polvo, *Octopus vulgaris* TAKAHASHI et al. (1964 a) encontraram máxima atividade proteolítica em pH 2,5 e LEBLANC & GILL (1982) verificaram em duas espécies de lula

pH. Ótimos em 2,6 e 3,6 para *Illex illecebrosus* e *Loligo pealei*, respectivamente, que são indicativos de proteases ácidas.

Embora a tripsina, um importante membro das proteases serínicas, seja conhecida detalhadamente com relação a sua estrutura e função, na verdade pouco se sabe sobre as proteases dos invertebrados quando são comparadas com as dos vertebrados ou de bactérias. Em crustáceos decápodos, um fenômeno geralmente característico, é o da ocorrência da tripsina em múltiplas formas. Então, sua diferenciação é feita através do estudo de propriedades eletroforéticas e imunológicas, dificultando a análise da seqüência de aminoácidos (TITANI et al., 1983).

Segundo DEVILLEZ & BUSCHLEN (1967), que estudaram as enzimas digestivas tripticas em várias espécies de crustáceos, o suco gástrico e a glândula digestiva da craca *Balanus nubilus* possui atividade em meio alcalino menor que a registrada para anfípodos, isópodos ou decápodos. DEVILLEZ (1975) mostrou que a maior atividade proteolítica do fluido digestivo da craca *Balanus nubilus* ficou limitada à faixa ácida, com pH ótimo variando de 3,5 a 6,4 de acordo com o utilizado (hemoglobina, azocaseína ou caseína).

Dentre outras características encontradas para a tripsina, GATES & TRAVIS (1969) isolaram esta enzima de hepatopâncreas de camarão *Penaeus setiferus* cujo peso molecular é igual a 24.000, tem ponto isoelétrico ácido, não requer íons de cálcio (Ca^{++}) para sua estabilidade, é resistente a autodigestão e experimental inativação de forma irreversível em pH inferior a 5,0. Além do mais, a composição provável de aminoácidos da molécula sugere algumas diferenças em sua estrutura total, parecendo não haver indícios de que essa enzima possua a forma de zimógeno.

BRUN & WOJTOWICZ (1976) descobriram duas proteinases em hepatopâncreas dos caranguejos *Cancer borealis* e *C. irroratus* com pH ótimos em 3,8 e 8,0 e peso molecular de 16.700 e 20.500, respectivamente. De acordo com TOMÁŠEK et

al. (1970) a protease isolada do trato digestivo do caranguejo *Astacus leptodactylus* apresenta a mesma especificidade da tripsina bovina, sendo inibida tanto por inibidores naturalmente presentes como por inibidores sintéticos. Mais tarde ZWILLING et al. (1975) a identificaram como sendo uma protease serínica.

ZWILLING et al. (1979) apontaram a presença de uma carboxipeptidase no fluido digestivo do crustáceo *Astacus fluviatilis*. Outros estudos empreendidos por ZWILLING et al. (1981) revelaram uma enzima proteolítica de baixo peso molecular (11.000) que pode pertencer a uma nova família. Essa endopeptidase hidrolisa a caseína e outros substratos de proteína e peptídeo, sendo inativa sobre qualquer substrato específico para tripsina e quimiotripsina. A distribuição dessa proteína de baixo peso molecular ainda é desconhecida em outros invertebrados e, parece que nos animais vertebrados ela está completamente ausente. Entretanto, PFLEIDERER et al. (1967); DEVILLEZ & LAU (1969); DEVILLEZ & LAU (1970) e ARMSTRONG & DEVILLEZ (1978) demonstraram a presença de uma protease de baixo peso molecular em suco digestivo de outros crustáceos. Para DEVILLEZ & LAU (1969) essa enzima tem ampla especificidade de endopeptidase com preferência por ligações peptídicas de leucina. Segundo GATES & TRAVIS (1969) é possível que enzimas desse tipo também ocorram em camarão.

As enzimas proteolíticas digestivas têm sido extensivamente estudadas em crustáceos, especialmente os decápodos.

TAKAHASHI et al. (1964) observaram rápida hidrólise de caseína pelos extratos preparados a partir de hepatopâncreas e intestino de lagosta *Panulirus japonicus*; enquanto a hidrólise nos de estômago foi muito lenta. O hepatopâncreas dos cefalópodos e da lagosta *P. japonicus* exibiram atividade enzimática muito mais significativa que a demonstrada em fígado de peixe (TAKAHASHI et al., 1964 a).

BROCKERHOFF et al. (1970) estudaram as enzimas digestivas da lagosta *Homarus americanus* e encontraram duas

proteínases com pH. Ótimos em torno de 4,0 e 8,0 e com baixo peso molecular, além de uma enzima do tipo tríptica com pH ótimo de 7,9 a 8,1 e peso molecular de 25.000, estimado por filtração em gel Sephadex G-100.

TRELLU & CECCALDI (1976) estudaram as enzimas proteolíticas em músculo e hepatopâncreas de crustáceo decápodo *Palaemon serratus*. SAKER et al. (1982) usaram, como fonte de proteases, hepatopâncreas e, VIEIRA et al. (1985) investigaram a presença dessas enzimas em hemolinfa de jovens da lagosta *Panulirus laevicauda*, todos relacionando a atividade enzimática com as alterações que ocorrem naturalmente durante os estágios do ciclo de muda.

Através da determinação da atividade enzimática também é possível se acompanhar processo de deterioração da proteína muscular. A atividade enzimática foi observada através do aumento do valor de tirosina por SALEM et al. (1970) para acompanhar a decomposição em músculo dos crustáceos *Metapenaeus stebbingi* e *Callinectes sapidus* e dos moluscos *Tapes decussata* e *Omnastrephes arabicus*. FOLCO et al. (1984) estudaram a ação das proteases de músculo esquelético de corvina branca *Micropogon opercularis* sobre as proteínas miofibrilares e concluíram que possivelmente a protease I degrada as cadeias de meromiosina pesada, componente do complexo actomiosina, enquanto a protease II não afeta a actomiosina sob as mesmas condições.

3 - MATERIAL E MÉTODOS

3.1 - Material

Foi utilizado hepatopâncreas de lagostas do gênero *Panulirus* White, capturadas na Costa de Fortaleza e obtidas vivas junto à Colônia de Pescadores do Mucuripe, em Fortaleza-Ceará.

Os hepatopâncreas foram removidos dos cefalotórax e, em seguida, macerados em graal de porcelana e homogeneizados em Potter (TRI-R STIR-R Modelo K 41) a aproximadamente 8.000 rpm por dois minutos a 4°C.

3.2 - Preparação do pó cetônico

Os hepatopâncreas homogeneizados foram suspensos em acetona (-15°C) na proporção de 1:5 (p/V) e deixados em agitação por uma hora. Após este período o material foi filtrado a vácuo com auxílio de um funil de Büchner e ressuspensão em acetona. Esta operação foi repetida duas vezes, quando a acetona já não apresentava mais coloração amarelada. Finalmente, o material foi submetido ao tratamento com acetona e éter etílico na proporção de 1:1 (V/V) a -15°C e, em seguida, filtrado a vácuo. Todo o procedimento de preparação do pó cetônico foi realizado em câmara fria a 4°C.

O pó cetônico, assim preparado, foi deixado a temperatura ambiente para possibilitar a evaporação do solvente, sendo pesado, estocado em frasco de vidro e mantido a 4°C.

3.3 - Preparação do extrato

A partir do pó cetônico foi preparado um extrato na proporção de 1:100 (p/V) em tampão fosfato 0,01M contendo cloreto de sódio 0,1M pH 7,0, por homogeneização em Potter durante um minuto a 5.000 rpm, centrifugação (Centrífuga IEC Modelo HT) a 20.000 x g por trinta minutos a 4°C e filtração em papel Whatman 42.

O extrato assim obtido, denominado extrato bruto, foi utilizado para determinação de proteína e da atividade proteolítica.

3.4 - Fracionamento por precipitação com sulfato de amônio

Ao extrato bruto de hepatopâncreas de lagosta foi adicionado, gradualmente, sulfato de amônio - $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ sólido de modo a atingir 20% de saturação. O precipitado foi removido por centrifugação a 20.000 x g por trinta minutos a 4°C (Centrífuga IEC Modelo HT). O sobrenadante resultante foi usado para as próximas precipitações com 40, 60, 80 e 100% de saturação com sulfato de amônio. Os precipitados obtidos foram suspensos em tampão fosfato 0,01M contendo cloreto de sódio 0,1M pH 7,0 e dialisados contra água destilada a 4°C, durante um período de tempo suficiente para que a reação entre a água e o hidróxido de bário apresentasse resultado negativo.

As frações obtidas, denominadas 0/20, 20/40, 40/60, 60/80 e 80/100, foram suspensas em tampão fosfato 0,01M contendo cloreto de sódio 0,1M pH 7,0 sendo usadas para a determinação do teor de proteína e da atividade proteolítica.

3.5 - Determinação de proteína

No extrato bruto e nas frações obtidas por fracionamento com sulfato de amônio o teor de proteína foi determinado pelo método do microbiureto (GOA, 1953), usando-se como padrão a albumina sérica bovina (Sigma) (FIGURA 3).

Nos ensaios posteriores ao fracionamento por precipitação com sulfato de amônio a concentração de proteína foi determinada pelo método do Folin (LOWRY et al., 1951), usando como padrão a tirosina (Merck) (FIGURA 4).

3.6 - Determinação da atividade enzimática

A atividade proteolítica foi definida como a capacidade de hidrolisar a caseína ou hemoglobina.

A reação enzimática, com 10 ml de volume final, desenvolveu-se pela adição de 1,0 ml do extrato bruto de hepatopâncreas de lagosta a 5,0 ml de hemoglobina (Sigma) a 1% em solução tampão citrato ou caseína (segundo Hammarsten, E. Merck AG Darmstadt) a 1% em solução tampão fosfato ou borato.

A incubação foi realizada à temperatura de 40°C por sessenta minutos em banho-maria (Unitemp - Fanem). Parou-se a reação enzimática com a adição de 1,0 ml de ácido tricloroacético (TCA) a 40% (AINOUZ et al., 1972). Após trinta minutos de repouso, a mistura foi filtrada em papel de filtro Whatman 42, sendo a atividade proteolítica estimada na fração solúvel em TCA e quantificada pela leitura da absorbância a 750 nm em espectrofotômetro (Bausch & Lomb modelo Spectronic 20), depois da reação com o reagente fenólico de Folin - Ciocalteu (LOWRY et al., 1951). O branco da reação foi obtido pela adição do substrato após a colocação do TCA a 40%. Todos os valores de absorbância dos brancos foram subtraídos dos valores das amostras.

3.6.1 - Concentração do substrato

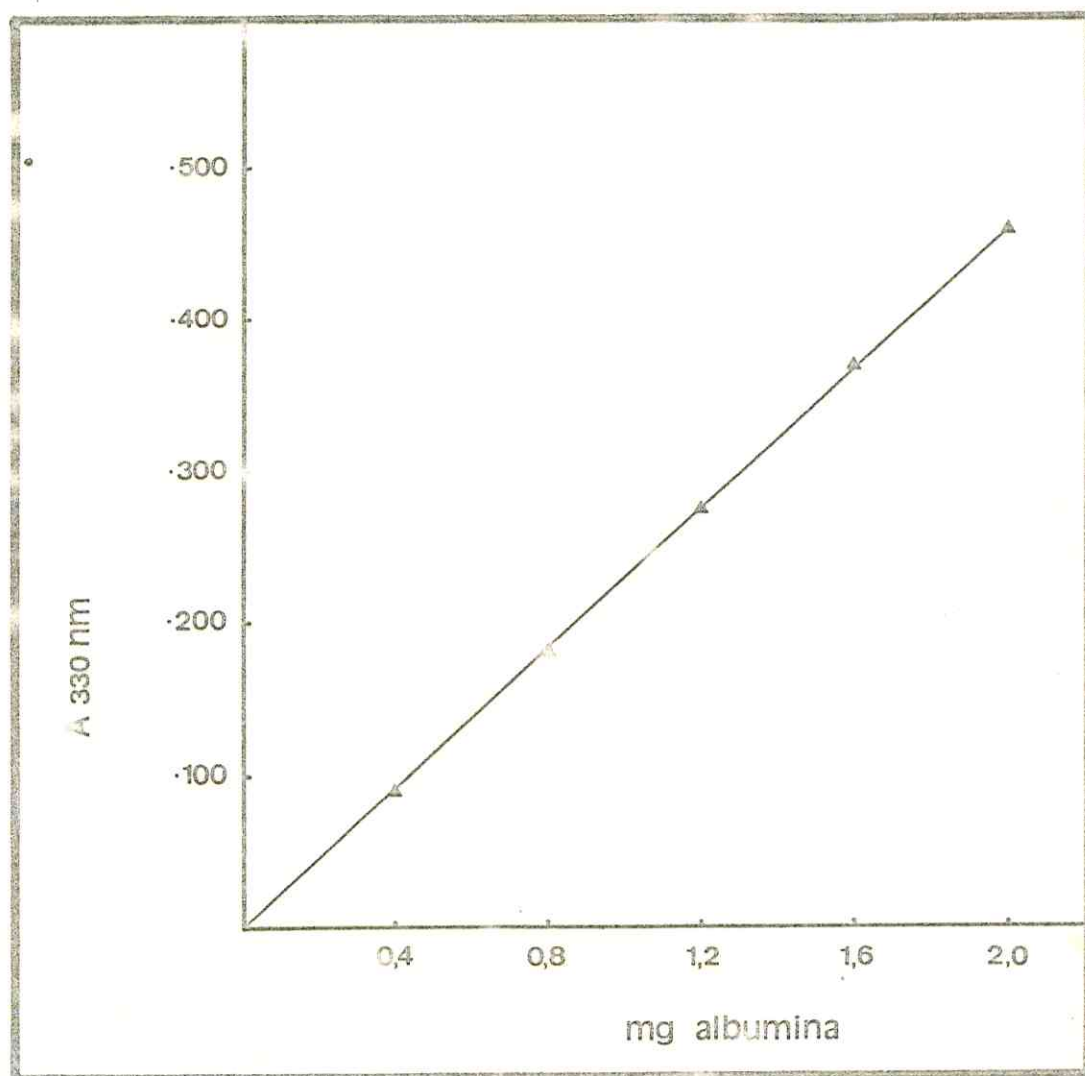


FIGURA 3 - Curva padrão da albumina sérica bovina (Sigma) pelo método do microbiureto (GOA, 1953).

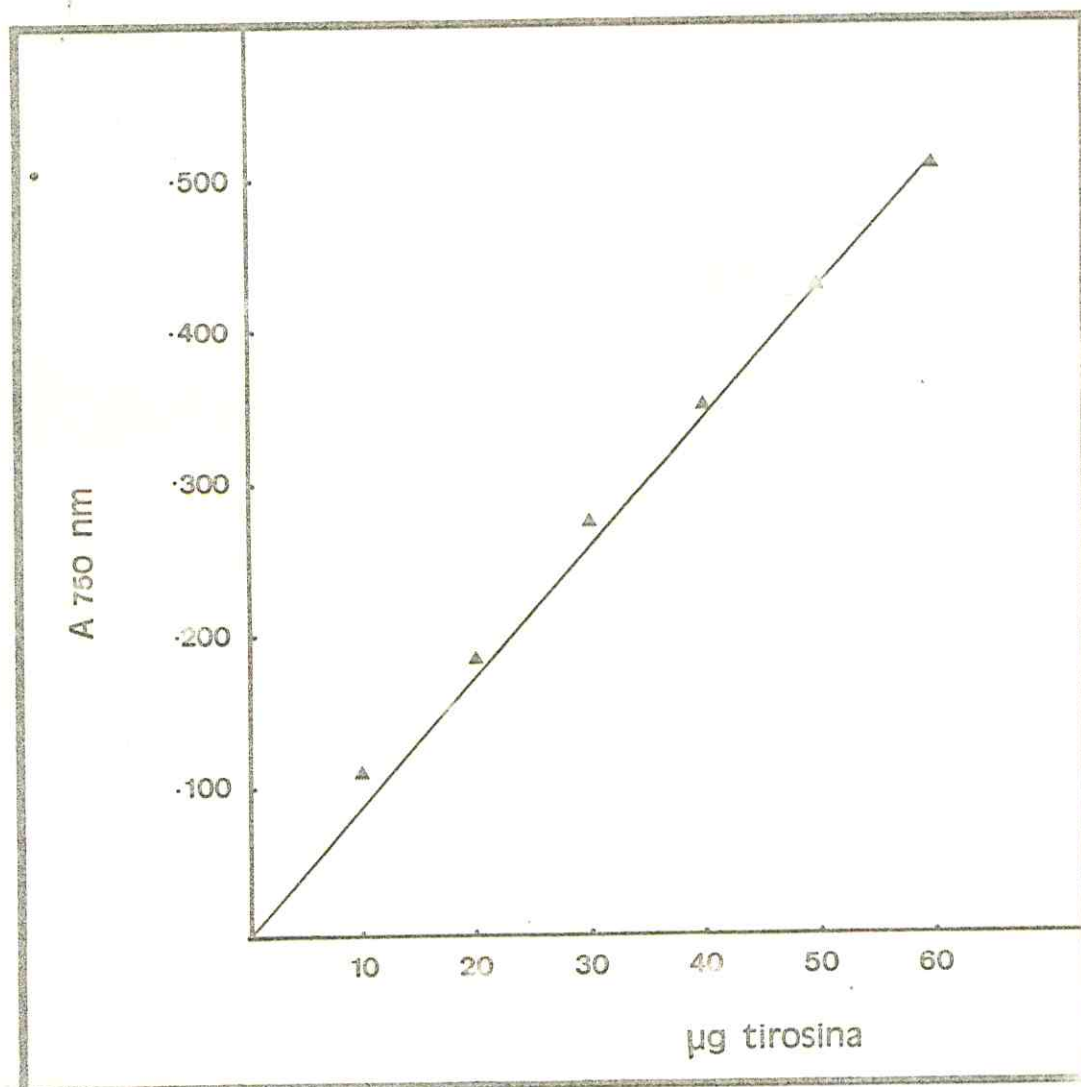


FIGURA 4 - Curva padrão da tirosina (Merck) pelo método de Folin (LOWRY et al., 1951).

Para a determinação da concentração ideal de substrato a ser usada, foram feitos ensaios com caseína (10 a 70 mg), mantendo-se o volume do extrato constante e igual a 1,0 ml preparado na proporção de 1 mg de liofilizado para 1,5 ml de tampão fosfato 0,01M contendo cloreto de sódio 0,1M pH 7,0. A reação procedeu-se à temperatura de 40°C por sessenta minutos.

Definidos os valores de tempo e temperatura, nova relação enzima-substrato foi determinada, usando-se um extrato cuja proporção era 0,5 g de liofilizado para 1,5 ml de tampão fosfato 0,01M contendo cloreto de sódio 0,1M pH 7,0.

3.6.2 - Efeito do pH

A determinação do pH ótimo do sistema enzimático foi estudada em extrato bruto de hepatopâncreas de lagosta na proporção de 1:100 (p/V) usando-se tampão ácido cítrico 0,1M - Na_2HPO_4 0,2M nos pHs 2,6; 3,0; 3,6; 4,0; 4,6 e 5,0, tampão KH_2PO_4 0,1M - NaOH 0,1M nos pHs 6,0; 6,5; 7,0 e 7,5 e tampão KCl + H_3BO_3 0,5M - NaOH 0,5M nos pHs 8,0; 8,5; 9,0; 9,5 e 10,0, citados por DAWSON *et al.* (1969). Os substratos (hemoglobina e caseína 1%) também foram preparados nos mesmos intervalos de pH, sendo que de 2,6 a 5,0 o substrato empregado foi a hemoglobina e de 6,0 a 10,0, esta foi substituída pela caseína.

Nas frações obtidas pelo fracionamento por precipitação com sulfato de amônio onde maior atividade enzimática foi registrada, outra curva de pH foi efetuada no intervalo entre 6,0 e 10,0. Os extratos foram preparados pela dissolução de 1 mg das frações liofilizadas em 1,5 ml de tampão fosfato 0,01M contendo cloreto de sódio 0,1M pH 7,0.

As condições de ensaio obedeceram os mesmos padrões dos anteriores.

3.6.3 - Efeito da temperatura e do tempo

A temperatura e o tempo de reação foram estabelecidos mediante a incubação do ensaio enzimático em temperaturas de 40, 50, 55 e 60°C por trinta, sessenta, noventa e cento e vinte minutos.

Os extratos foram preparados na proporção de 0,5 mg de liofilizado para 1,5 ml de tampão fosfato 0,01M contendo cloreto de sódio 0,1M pH 7,0.

3.6.4 - Termoestabilidade

A estabilidade térmica do sistema enzimático foi avaliada submetendo-se o extrato preparado com 0,5 mg de liofilizado em 1,5 ml de tampão fosfato 0,01M contendo cloreto de sódio 0,1M pH 7,0 a pré-incubação em temperatura de 40, 50 e 60°C durante quinze, trinta, quarenta e cinco e sessenta minutos. Decorrido cada intervalo de tempo, o extrato era retirado do banho-maria e nele determinada a atividade enzimática a 50°C por sessenta minutos.

Os resultados de atividade proteolítica específica foram transformados em percentagem de atividade, considerando-se 100% a atividade do extrato não submetido ao aquecimento prévio.

3.6.5 - Ativadores/inibidores

O comportamento do sistema enzimático foi pesquisado no extrato de hepatopâncreas de lagosta preparado com 0,5 mg de liofilizado em 1,5 ml de tampão fosfato 0,01M contendo cloreto de sódio 0,1M pH 7,0, frente aos compostos: cloreto de cálcio ($\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$), cloreto de mercúrio (HgCl_2),

cloreto de sódio (NaCl), cloreto de ferro III ($\text{Fe}_3\text{Cl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$), etilenodiaminotetracético (EDTA), cloreto de manganês ($\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$), tiosulfato de sódio ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$), ácido ascórbico ($\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_6$), ácido cítrico ($\text{H}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7$), 2-mercaptoetanol ($\text{HSCH}_2\text{CH}_2\text{OH}$) e biosulfito de sódio ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$) na concentração de 1 mM.

A reação enzimática sem a adição de qualquer reagente químico (controle) foi considerada 100%. A reação ocorreu a 50°C por sessenta minutos.

3.7 - Unidade de proteinase

A atividade proteolítica do sistema enzimático de hepatopâncreas foi definida arbitrariamente como unidade de proteinase (U.P.), sendo a quantidade de produto da reação enzimática, nas condições especificadas (50°C e sessenta minutos), solúvel em TCA e equivalente a 50 μg de tirosina. Os resultados desta atividade proteolítica foram expressos em U.P./ml e a atividade proteolítica específica, em U.P./mg de proteína.

3.8 - Cromatografia em Sephadex G-100

A partir da fração 20/40, obtida por precipitação do extrato bruto com sulfato de amônio, foi preparado um extrato na proporção de 15 mg de liofilizado por ml de tampão fosfato 0,01M contendo cloreto de sódio 0,1M pH 7,0, o qual foi passado em coluna de gel de Sephadex G-100 (Pharmacia), medindo 26 x 1,7 cm. O suporte foi tratado conforme instruções do fabricante (GEL FILTRATION) e as colunas foram equilibradas e eluídas com o mesmo tampão. Todas as cromatografias foram feitas a temperatura ambiente (ca 26°C) usando o fluxo de 30 ml/h e os efluentes coletados em frações de 3,0 ml, com auxílio de bomba peristáltica (Pharmacia) graduada em

3,4 e coletor Beckman.

A eluição foi seguida pela medida de absorvância em espectrofotômetro (Varian série 634) a 280 nm.

Posteriormente, o teor de proteína e a atividade proteolítica foram determinados nos efluentes.

As massas moleculares foram estimadas usando-se a fórmula de DETERMAN & MICHEL (1966),

$$\text{Log M} = 5,941 - 0,847 (\text{Ve}/\text{Vo})$$

onde:

Ve = volume de eluição

Vo = volume de exclusão

3.9 - Comparação com enzimas comerciais

A atividade proteolítica do sistema enzimático presente em hepatopâncreas de lagosta foi comparada com a de três proteases encontradas no mercado e denominadas A, B e C.

O extrato de hepatopâncreas de lagosta foi preparado na proporção 0,5 mg/ml, e os das proteases A e B com 1 mg/ml e aquele da C igual a 10 mg/ml (pó liofilizado: meio de extração).

As proteases comerciais foram previamente caracterizadas quanto aos seus parâmetros ótimos de reação, de modo semelhante ao que foi feito para o sistema enzimático de hepatopâncreas.

A reação enzimática foi procedida de forma idêntica ao descrito no item 3.6.

4 - RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 - Hepatopâncreas/pô cetônico

O hepatopâncreas localiza-se no cefalotórax, como as demais vísceras, sendo formado por um ou mais pares de apêndices glandulares. Esses divertículos digestivos nos decápodos representam morfologicamente os pares de cecos anteriores, os quais estão presentes quase universalmente nos crustáceos em diversas formas e dimensões.

Segundo TRAVIS (1955) o hepatopâncreas atua na segregação das enzimas digestivas, absorção e transformação do alimento, sendo o maior depósito de estocagem das reservas orgânicas e minerais e, conseqüentemente, o órgão mais importante sob o aspecto de que a partir dele, tais reservas são mobilizadas quando requeridas por outros tecidos.

O hepatopâncreas é tipicamente uma glândula exócrina, com suas estruturas microscópicas completamente distintas daquelas presentes no fígado dos animais vertebrados. Entretanto, na realidade ele funciona como tal, tendo em vista que substâncias como glicogênio e gordura são armazenadas em grandes quantidades em suas células, apesar de que no fígado não há produção de enzimas digestivas, função desempenhada pelo pâncreas. Assim, embora ainda muito polêmica a nomenclatura deste órgão, dois pontos parecem bem definidos: (a) o hepatopâncreas é uma glândula, e (b) encontra-se situado próximo ao intestino médio estando conectado diretamente a ele (VAN WELL, 1974).

O hepatopâncreas dos crustáceos tem sido extensivamente estudado com relação à caracterização das enzimas di

gestivas presentes. No caso particular das lagostas do gênero *Panulirus* White, o hepatopâncreas representa aproximadamente 7% do peso do cefalotórax do animal.

O processo de remoção da água dos tecidos pelo tratamento com acetona é um método amplamente utilizado na preparação de enzimas (KELLER et al., 1956; FOLK & SCHIERMER, 1965; PRAHL & NEURATH, 1966; REECK & NEURATH, 1972; BRUN & WOJTOWICZ, 1976; MAYZAUD & MAYZAUD, 1981; HOLZMAN et al., 1982; GRANT et al., 1983; VO et al., 1983; YOSHINAKA et al., 1983), porque esse procedimento não resulta em perdas significantes da atividade proteolítica, além de conservá-la por um longo período de tempo.

A preparação do pó cetônico a partir do hepatopâncreas fresco foi estimado como sendo da ordem de 20%, em média.

4.2 - Fracionamento com sulfato de amônio

O processo de purificação através da adição gradual de sulfato de amônio tem sido amplamente utilizado para enzimas proteolíticas (SUNDARAM & SARMA, 1960; GRONINGER JR., 1964; GATES & TRAVIS, 1969; MAKINODAN & IKEDA, 1969 b; HUANG & TAPPEL, 1971; BAUER & EITENMILLER, 1974; MURAKAMI & NODA, 1981; NODA & MURAKAMI, 1981; SAKER et al., 1982; JÓNÁS et al., 1983; HARA et al., 1984; VIEIRA et al., 1985; SIQUEIRA, 1986). De um modo geral, o intervalo de 20 a 80% de saturação com sulfato de amônio é aquele verificado com maior frequência para proteases de pescado, embora não seja muito diferente quando outros materiais são utilizados como fonte de investigação (TALLAN et al., 1952; GREENBAUM & FRUTON, 1957; KOLSZALKA & MILLER, 1960; PARRISH JR. & BAILEY, 1966; PARRISH JR. & BAILEY, 1967; MARTINS & WHITAKER, 1968; PRISCO & VIEIRA, 1976; AINOUS et al., 1981).

O primeiro passo para a purificação do sistema enzimático foi o tratamento com sulfato de amônio sólido. Es

te sal foi sendo adicionado gradualmente e as frações de 20-40 e 40-60% de saturação foram aqueles que exibiram maior atividade proteolítica específica (TABELA 1, FIGURA 5). Verifica-se que houve uma recuperação de cerca de aproximadamente 9,4 e 18,7% e uma purificação da ordem de 2,5 e 1,8 vezes, respectivamente nas frações 20/40 e 40/60 (TABELA 1).

SUNDARAM & SARMA (1960) submeteram a enzima presente no intestino do peixe *Etrophus suratensis* a cinco etapas de purificação conseguindo uma purificação da ordem de 200 vezes a uma recuperação de 21%, ao passo que a proteinase de músculo de albacora foi purificada 260 vezes com apenas 2,3% de recuperação (GRONINGER JR., 1964). O fracionamento com sulfato de amônio e cromatografia em coluna de Sephadex G-75 conferiram ao sistema enzimático de hepatopâncreas de camarão *Penaeus setiferus* uma purificação de 6,3 vezes com 47,9% de recuperação e de 115 vezes com 43% de recuperação para a enzima alcalina de músculo de carpa obtida do mesmo modo, porém com a resina G-200 (MAKINODAN & IKEDA, 1969 a). Quando a proteinase ácida presente em músculo de carpa foi tratada com sulfato de amônio e acetona e eluída com Sephadex G-200 sua purificação foi da ordem de 200 vezes (MAKINODAN & IKEDA, 1969 b). As enzimas digestivas de peixes de diferentes hábitos alimentares foram purificadas de 5 a 8 vezes e de 10 a 15 vezes quando tratadas com sulfato de amônio e com Sephadex G-100 e G-150, respectivamente (JÓNÁS et al., 1983).

4.3 - Efeito do pH

A influência do pH na ação catalítica das enzimas tem sido extensivamente estudada, uma vez que sua ocorrência é verificada dentro de intervalos limitados de pH. De um modo geral, cada reação enzimática exibe seu pH ótimo; contudo, se a mesma enzima atua em diferentes substratos, o valor ótimo de pH pode variar em cada caso. Assim, de acordo com KELVIN (1963) uma carboidrase requer diferentes pHs óti

TABELA 1 - Fracionamento do sistema enzimático presente em hepatopâncreas de lagosta do gênero *Panulirus* White por sulfato de amônio.

Frações	Volume (ml)	Proteína*		Atividade proteolítica			Recuperação da atividade (%)	Veze de purificação
		(mg/ml)	Total (mg)	(U.P./ml)	Total (U.P.)	Específica (UP/mg prot.)		
Extrato bruto	100	3,07	307	40,26	4.026	13,11	100	1
0/20	50	zero	-	zero	-	-	-	-
20/40	50	0,235	11,75	7,59	379,5	32,30	9,43	2,46
40/60	50	0,657	32,85	15,09	754,5	22,97	18,74	1,75
60/80	50	0,289	14,45	4,77	238,3	16,51	5,92	1,26
80/100	50	zero	-	1,52	76,0	-	-	-

Os dados referem-se à extração de 1g de pó cetônico.

* A proteína foi determinada pelo método do microbiureto.

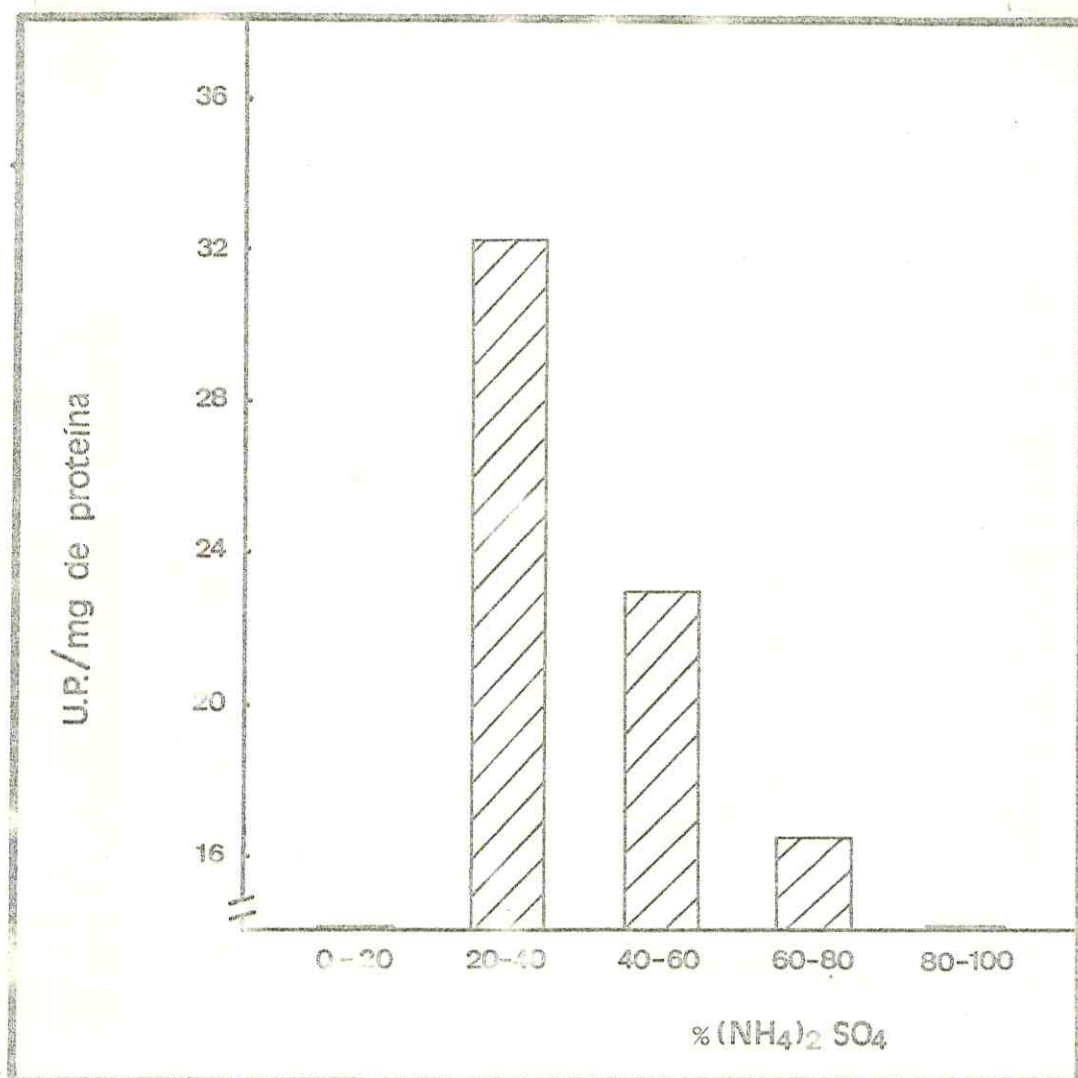


FIGURA 5 - Atividade proteolítica específica do sistema enzimático presente em hepatopâncreas de lagosta do gênero *Panulirus* White, em função do seu tratamento com sulfato de amônio.

mos para os vários açúcares sobre os quais ela atua, enquanto a pepsina possui somente uma faixa muito limitada de pH variando entre 1,5 e 2,5, dependendo do substrato protéico.

Segundo LEHNINGER (1985) as enzimas possuem um pH ótimo característico, no qual sua atividade catalítica é máxima. As curvas de variação da atividade enzimática em diferentes valores de pH, refletem o pH no qual importantes grupos doadores ou receptores de prótons no sítio catalítico estão no seu estado de ionização adequados. Como tais intervalos de variação ocorrem de maneira muito limitada, estudos com sistemas biológicos somente são possíveis quando se mantêm um controle rígido do pH do meio.

A classificação das enzimas proteolíticas digestivas dos invertebrados tem sido frequentemente baseada nos estudos de pH ótimo utilizando como matéria-prima extratos brutos de tecidos do trato digestivo. Entretanto, tal dado fornece pouca informação sobre a natureza dos componentes proteolíticos envolvidos na digestão das proteínas, visto que as proteases experimentam uma distribuição universal nas células vivas e o pH ótimo, isoladamente, constitui-se em um fraco critério de classificação.

A primeira tentativa para caracterizar a especificidade das proteases em crustáceos foi feita por SHINODA (1928), que encontrou três enzimas em *Astacus macrodactylus*, as quais foram separadas em relação ao seu pH ótimo (HUGGINS & MUNDAY, 1968).

A atividade proteolítica do sistema enzimático de hepatopâncreas foi determinada em uma faixa de pH que variou de 2,6 a 10,0. Na faixa ácida, usando-se a hemoglobina a 1% como substrato, foi verificado um valor máximo em pH 3,6, correspondendo a aproximadamente 30% da atividade registrada na faixa alcalina, quando o substrato foi a caseína a 1%, onde a atividade máxima foi observada no intervalo de pH compreendido entre 7,5 e 9,0 (TABELA 2, FIGURA 6). O teor de proteína no extrato bruto, determinado pelo método do microbiureto (GOA, 1953), foi de 3,07 mg/ml.

No sistema enzimático fracionado por precipitação

TABELA 2 - Variação da atividade proteolítica do sistema enzimático de hepatopâncreas de lagosta do gênero *Panulirus* White, em função do pH de reação.

pH da reação	Atividade proteolítica (U.P./ml)	Atividade proteolítica específica (U.P./mg de proteína*)
2,6	7,47	2,43
3,0	9,37	3,05
3,6	12,60	4,11
4,0	11,44	3,73
4,6	7,70	2,51
5,0	9,80	3,19
6,0	31,51	10,26
6,5	33,84	11,02
7,0	35,59	11,59
7,5	39,09	12,73
8,0	40,26	13,11
8,5	40,26	13,11
9,0	39,68	12,92
9,5	31,51	10,26
10,0	21,01	6,84

Os dados referem-se à extração de 1 g de pó cetônico.

* A proteína foi determinada pelo método do microbiureto.

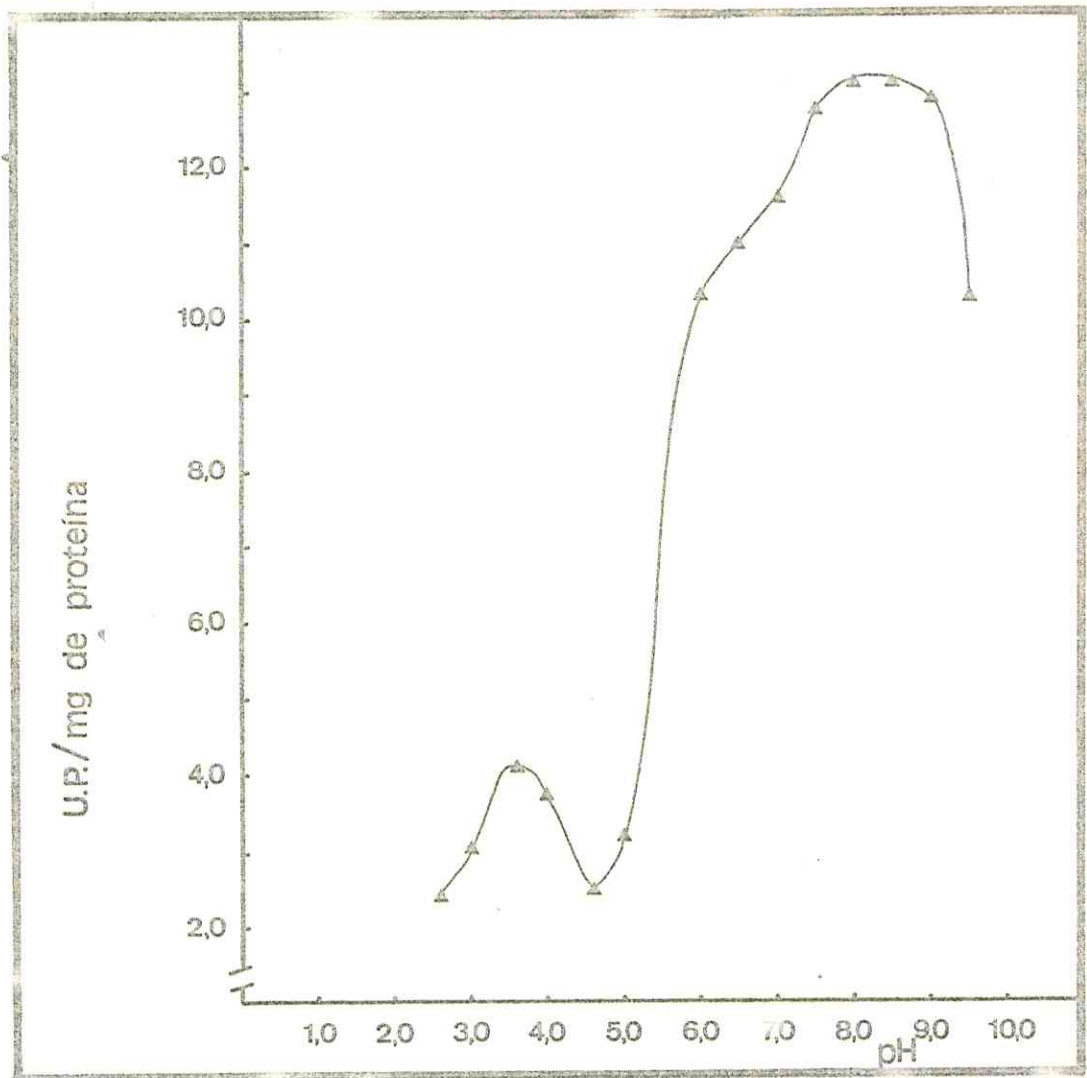


FIGURA 6 - Variação da atividade proteolítica específica do sistema enzimático presente em hepatopâncreas de lagosta do gênero *Panulirus white* no extrato bruto, em função do pH de reação.

com sulfato de amônio, foi procedida outra curva de pH cujos valores variaram de 6,0 a 9,5. O pH ótimo foi, então, estabelecido como sendo igual a 8,0 (TABELA 3, FIGURA 7) para as frações 20/40 e 40/60% obtidas pelo referido tratamento, sendo os teores de proteína, calculados pelo Folin (LOWRY et al., 1951), iguais a 0,129mg/mg de liofilizado e 0,189mg/mg de liofilizado, respectivamente. Esses valores de concentração de proteína foram os mesmos para todas as determinações dos parâmetros de caracterização do sistema enzimático de hepatopâncreas de lagosta, exceto quando alguma referência for mencionada.

Diversas espécies de peixe foram estudadas com relação às enzimas presentes no tecido muscular. A proteinase isolada de músculo de albacora, *Thunnus alalunga* (GRONINGER JR., 1964) exibiu pH ótimo de 2,4 a 2,5. Em músculo de peixe das espécies *Scomber japonicus*, *Sardinops melamosticta*, *Seriola quinqueradiata* e *Gadus macrocephalus*, MAKINODAN & IKEDA (1969) não encontraram atividade enzimática na faixa alcalina, embora elevada atividade proteolítica tenha sido observada no intervalo de pH compreendido entre 2,6 e 3,5; um pH ótimo em 8,0 (MAKINODAN & IKEDA, 1969 a) e outro na faixa entre 2,8 - 3,0 foram encontrados para os sistemas enzimáticos isolados de músculo de carpa (MAKINODAN & IKEDA, 1969 b). No músculo esquelético de corvina branca *Micropogon opercularis*, BUSCONI et al. (1984) encontraram duas proteases alcalinas, uma com pH ótimo igual a 8,5 e a outra 9,1.

Um número muito maior de estudos tem sido empreendido utilizando órgãos e fluidos digestivos de peixe e crustáceos, além daqueles procedidos no tecido muscular.

Em ceco pilórico de salmão, *Oncorhynchus tshawytscha* CROSTON (1960) encontrou endopeptidases com pH ótimo de 9,0 e SUNDARAM & SARMA (1960) purificaram enzima do intestino do peixe *Etroplus suratensis* cujo pH de máxima atividade foi de 9,0 a 10,0. Para a protease extraída de fígado de cangulo *Balistes vetula*, a atividade proteolítica máxima ocorreu em pH 9,0 (SIQUEIRA, 1986), entretanto em fígado de *Theragra chalcogramma*, TAKAHASHI et al. (1964 a) encontraram enzimas

TABELA 3 - Variação da atividade proteolítica do sistema enzimático de hepatopâncreas de lagosta do gênero *Panulirus* White nas frações obtidas pelo fracionamento com sulfato de amônio no intervalo de 20-40 e 40-60% de saturação, em função do pH de reação.

pH da reação \ Fração	20/40		40/60	
	Atividade proteolítica (U.P./mg liofilizado)	Atividade proteolítica específica (U.P./mg proteína)	Atividade proteolítica (U.P./mg liofilizado)	Atividade proteolítica específica (U.P./mg proteína)
6,0	12,43	96,36	13,13	69,47
6,5	14,13	109,92	15,58	82,43
7,0	15,40	119,33	16,63	87,99
7,5	16,11	124,88	17,33	91,69
8,0	17,86	138,45	18,21	96,32
8,5	17,33	134,34	17,51	92,62
9,0	16,46	127,60	16,80	88,91
9,5	15,75	122,09	16,80	88,91

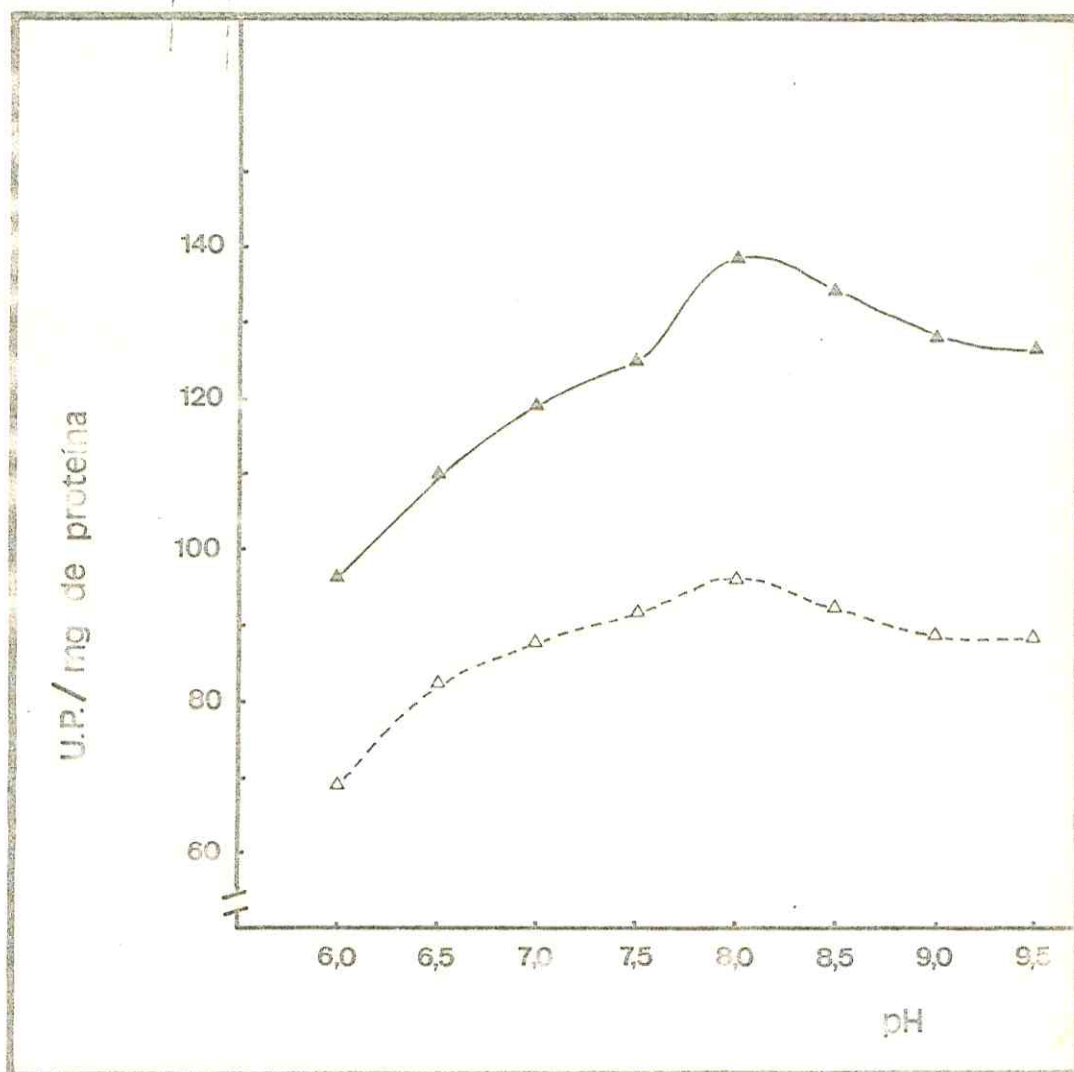


FIGURA 7 - Variação da atividade proteolítica específica do sistema enzimático presente em hepatopâncreas de lagosta do gênero *Panulirus* White, submetido ao fracionamento com sulfato de amônio no intervalo de 20-40 (Δ — Δ) e 40-60 (Δ ---- Δ) de saturação, em função do pH de reação.

com pH ótimo em 7,0. No pâncreas do peixe pulmonado *Protopterus aethiopicus* DE HAËN & GERTLER (1974) encontraram um novo tipo de protease serínica, denominada proelastase A. A carpa comum, *Cyprinus carpio* e a carpa capim *Ctenopharyngodon idella* exibiram atividade proteolítica máxima em pH 9,5 (DABROWSKI & GLOGOWSKI, 1977). Em extrato de rim de corvina, uma protease com pH ótimo igual a 8,0 foi observada por LIN et al. (1980). Segundo COHEN et al. (1981 a) as proteinases serínicas do pâncreas da carpa comum apresentaram alto grau de similaridade com aquelas de mamíferos. Três proteinases alcalinas foram isoladas de ceco pilórico de sardinha por MURAKAMI & NODA (1981), com pH ótimo entre 10,0 e 11,0. BENITEZ & TIRO (1982) encontraram atividade máxima entre pH 7,0 e 7,6 em órgãos digestivos dos peixes alimentados com algas unicelulares e, outro pico entre 9,5 e 10,0 tanto para os peixes alimentados com algas unicelulares quanto para aqueles cuja dieta foi à base de alga verde filamentosa. De acordo com JÓNÁS et al. (1983), as enzimas digestivas da carpa *Hypophthalmichthys molitrix* apresentaram aumento de atividade na faixa de pH entre 2,0 e 6,0, seguido por um platô entre 7,0 e 8,0 e aumentando novamente em pH superior a 8,0. A atividade encontrada no intestino da carpa comum *Cyprinus carpio* exibiu um incremento significativo entre pH 7,8 e 8,4, embora em pH 11,5 ainda persistisse uma elevada atividade proteolítica. No peixe *Silurus glanis* foi detectada máxima proteólise entre pH 7,0 e 8,0. Duas aminopeptidases da sardinha, *Sardinops melanosticta* foram examinadas por VO et al. (1983) e apresentaram atividade de máxima entre pH 7 e 7,5.

Os órgãos e fluidos digestivos dos crustáceos são fontes muito promissoras de substâncias de alto valor biológico como as enzimas proteolíticas que estão envolvidas no processo de digestão desses animais. A lagosta *Panulirus japonicus* exibiu pH: ótimos distintos em 2,0-2,5; 8,5-9,0 e 11,5 no hepatopâncreas e 8,5-9,0 no intestino (TAKAHASHI et al., 1964).

A enzima estudada por GATES & TRAVIS (1969) em hepa

topâncreas de camarão *Penaeus setiferus* apresentou máxima hidrólise de caseína no intervalo compreendido entre 7,0 e 9,5, enquanto aquela do caranguejo *Podophthalmus vigil* ocorreu em pH 6,0 (SATHER, 1969). ASAHARA (1973) encontrou em hepatopâncreas de camarão *Trachypenaeus curvirostris* máxima atividade em pH 8,4. TELFORD (1970) estudou enzimas digestivas no hepatopâncreas dos crustáceos *Cancer irroratus* e *C. borealis* e BRUN & WOJTOWICZ (1976) afirmaram que a atividade específica registrada para a primeira espécie foi superior àquela em *C. borealis*. MAUGLE et al. (1982) indicaram atividade proteolítica em pH 7,0 a 8,5 em hepatopâncreas de camarão *Penaeus japonicus*. Em hepatopâncreas de jovens da lagosta *Panulirus laevicauda*, SAKER et al. (1982) encontraram que a caseína era hidrolisada mais acentuadamente nos pHs 7,0 e 9,0. MURAMATSU & KAKIUCHI (1978) mostraram atividade em pH 8,0 usando hepatopâncreas de camarão *Parahaliporus sibogae*. GRANT et al. (1983) isolaram uma segunda protease serínica colagenolítica em hepatopâncreas de caranguejo *Uca pugilator*. A presença da protease I foi noticiada anteriormente por EISEN & JEFFREY (1969).

As proteinases digestivas dos caranguejos *Portunus trituberculatus*, *P. sanguinolentus* e *Charybdis japonica* exibiram estabilidade na atividade proteolítica na faixa de pH de 6,0 a 8,0 (GALGANI & NAGAYAMA, 1986).

Em suco gástrico de *Orconectes virilis*, DEVILLEZ (1965) encontrou atividade caseinolítica em pHs 6,0 e 7,5-8,5 e DEVILLEZ & BUSCHLEN (1967) detectaram máxima atividade em pH 4,0 em suco gástrico de craca, *Balanus nubilus* e, pelo menos, um ótimo de pH acima de 7,0 em isópoda *Lirceus* sp. e anfípoda *Synurella* sp. O pH ótimo de hidrólise de hemoglobina foi 3,5, de azocaseína 6,0 e de caseína 6,5 em fluido digestivo de craca, *Balanus nubilus* (DEVILLEZ, 1975). Entretanto, em suco gástrico de lagosta *Homarus americanus* foi determinada atividade tipo triptica em pH 8,0 (BROCKERHOFF et al., 1970). Usando a hemolinfa de indivíduos jovens da lagosta *Panulirus laevicauda*, VIEIRA et al. (1985) encontraram máxima atividade proteolítica nos pHs 7,0 e 9,0.

ZWILLING et al. (1979) mostraram que a carboxipeptidase do fluido digestivo do crustáceo *Astacus fluviatilis* exibiu pH ótimo em torno de 6,5. Mais tarde, foi isolada uma protease de baixo peso molecular (11.000) do mesmo caranguejo por ZWILLING et al. (1981). Essa enzima foi facilmente distinguida de proteínas contaminantes pelo seu baixo ponto isoelétrico e tamanho reduzido. Entretanto, os autores descartaram a possibilidade dessa protease ser um fragmento ativo de tripsina ou de carboxipeptidase, com base nos resultados de ensaios imunológicos, especificidade de clivagem e sequência parcial de aminoácidos. A tripsina do crustáceo *Astacus fluviatilis*, estudada por TITANI et al. (1983), apresentou características mais acídicas que a de origem bovina, resistência a autodigestão e desnaturação, de modo irreversível, quando em pH inferior a 3,0.

4.4 - Efeito da concentração do substrato

O efeito da variação da concentração do substrato $[S]$ na velocidade inicial (V_0) de uma reação enzimática, quando se mantém a concentração da enzima constante, é representado por uma hipérbole retangular. Assim, em concentrações muito baixas de substrato a velocidade da reação ocorre de forma muito lenta; entretanto, ela aumentará com um aumento na concentração de substrato, até um determinado limite, quando então não haverá correspondência de proporcionalidade direta, ou seja, aumentos cada vez maiores na concentração de substrato implicam em incrementos sempre menores na velocidade de reação, atingindo um ponto além do qual haverá apenas acréscimos desprezíveis na velocidade de reação, não importando o quanto seja aumentada a concentração de substrato. A velocidade da reação aproximar-se-á de um platô - velocidade máxima ($V_{m\acute{a}x}$), sem nunca atingi-lo de fato.

Embora seja difícil estabelecer exatamente em que concentração de substrato a velocidade máxima é atingida,

devido a sua aproximação ocorrer muito lentamente, Michaelis e Menten definiram uma constante, chamada K_M , que é útil para estabelecer a relação precisa entre a concentração de substrato e a velocidade da reação enzimática.

RICK (1965) encontrou que a concentração ótima de caseína hidrolisada pela quimiotripsina foi de 4 mg/ml, enquanto que a hidrólise máxima da hemoglobina ocorreu nas concentrações de 6,7 mg/ml com tripsina (RICK, 1965 a) e 1,6 mg/ml com pepsina (RICK, 1965 b). A atividade proteolítica máxima foi alcançada em suco proveniente do duodeno com 0,5 mg de azocaseína por ml do extrato (CHARNEY & TOMARELLI, 1947).

Os valores relativos ao estudo do efeito da concentração do substrato sobre a atividade enzimática das frações obtidas pelo tratamento com sulfato de amônio nos intervalos 20-40 e 40-60% de saturação, nas temperaturas de 40 e 50°C durante sessenta minutos, estão apresentados na TABELA 4 e FIGURAS 8 e 9, tendo revelado que em ambas as condições de ensaio, a saturação do complexo enzima-substrato ocorreu quando 50 mg de caseína reagiram com 0,5 ml do extrato proveniente da dissolução de 1 mg de liofilizado em 1,5 e 3,0 ml do tampão fosfato 0,01 M contendo cloreto de sódio 0,1 M pH 7,0, respectivamente para 40 e 50°C de incubação durante sessenta minutos.

Esse nível de saturação foi semelhante ao encontrado por GRONINGER JR. (1964); MAKINODAN & IKEDA (1969 a e b); SAKER et al. (1982) e SIQUEIRA (1986). Entretanto, VIEIRA et al. (1985) encontraram uma razão de 80 mg de caseína para protease de hemolinfa de lagosta.

4.5 - Efeito da temperatura e do tempo

A natureza protéica das enzimas tem sido destacada e é refletida na relação existente entre a temperatura e a atividade enzimática. À medida que a temperatura se eleva, a atividade enzimática aumenta a tal ponto que a velocidade

TABELA 4 - Variação da atividade proteolítica do sistema enzimático de hepatopâncreas de lagosta do gênero *Panulirus* White nas frações obtidas pelo fracionamento com sulfato de amônio no intervalo de 20-40 e 40-60% de saturação, em função da concentração de substrato. O ensaio enzimático foi realizado a 40 e 50°C por sessenta minutos.

Concentração do substrato (mg)	Temperatura (°C)							
	40				50			
	Frações							
	20/40		40/60		20/40		40/60	
Ativ. proteolítica		Ativ. proteolítica		Ativ. proteolítica		Ativ. proteolítica		
U.P./mg liofili- zado	Específi- ca U.P./ mg pro- teína	U.P./mg liofili- zado	Específi- ca U.P./ mg pro- teína	U.P./mg liofili- zado	Específi- ca U.P./ mg pro- teína	U.P./mg liofili- zado	Específi- ca U.P./ mg pro- teína	
10	11,55	89,56	10,85	57,42	23,46	181,83	22,06	116,70
20	14,70	113,99	15,58	82,43	31,86	246,97	30,11	159,30
30	15,40	119,41	15,93	84,28	34,31	265,97	33,26	175,98
40	16,45	127,56	16,80	88,91	36,41	282,25	36,41	192,65
50	16,63	128,91	16,10	85,21	37,46	290,39	37,81	200,06
60	16,28	126,20	17,86	94,47	37,5	290,39	37,81	200,06
70	16,45	127,56	19,61	103,73	39,5	306,68	38,5	203,76

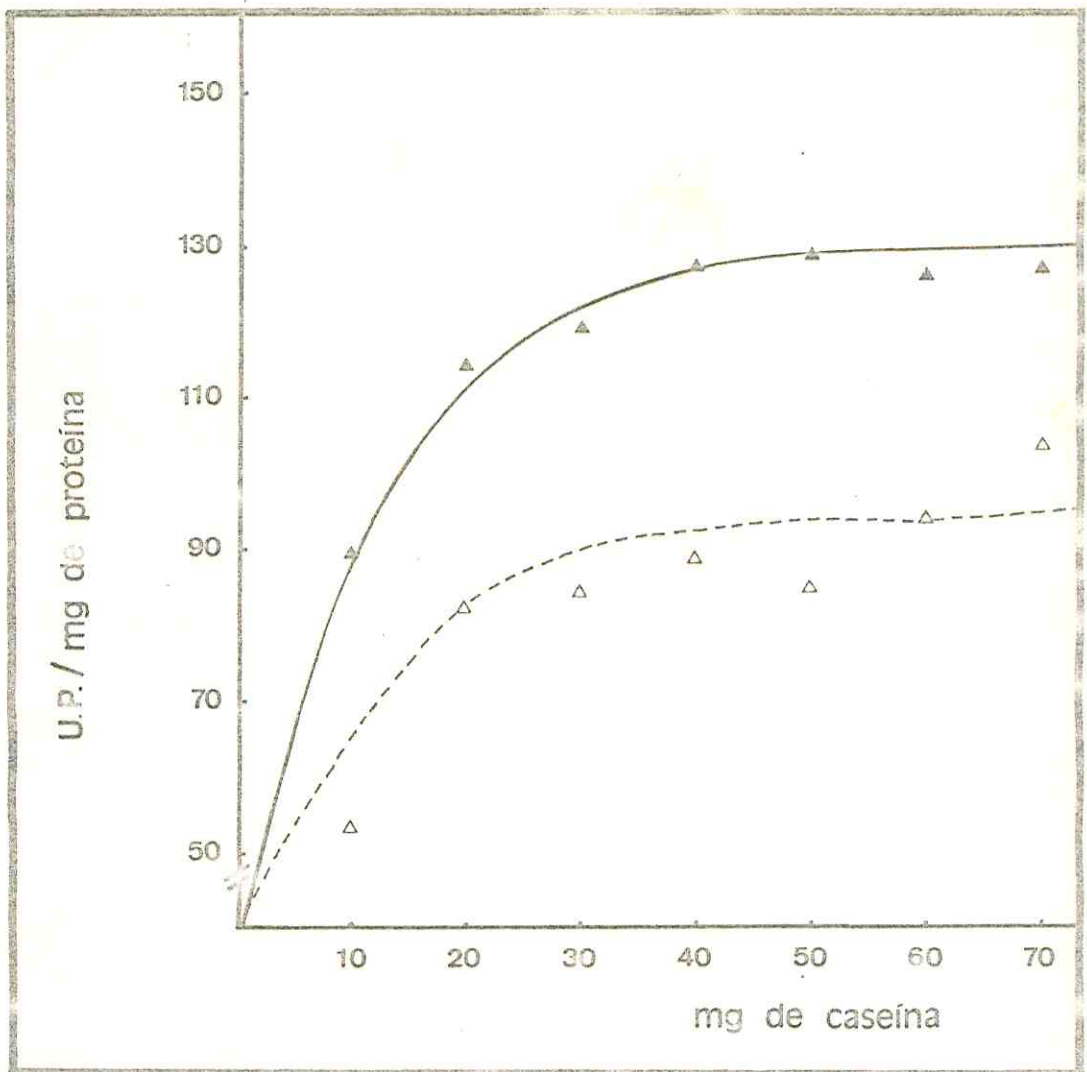


FIGURA 8 - Variação da atividade proteolítica específica do sistema enzimático presente em hepatopâncreas de lagosta do gênero *Panulirus* White, submetido ao fracionamento com sulfato de amônio no intervalo de 20-40 (\blacktriangle — \blacktriangle) e 40-60% (\triangle ---- \triangle) de saturação, em função da concentração de substrato. A reação enzimática foi realizada a 40°C por 60 minutos.

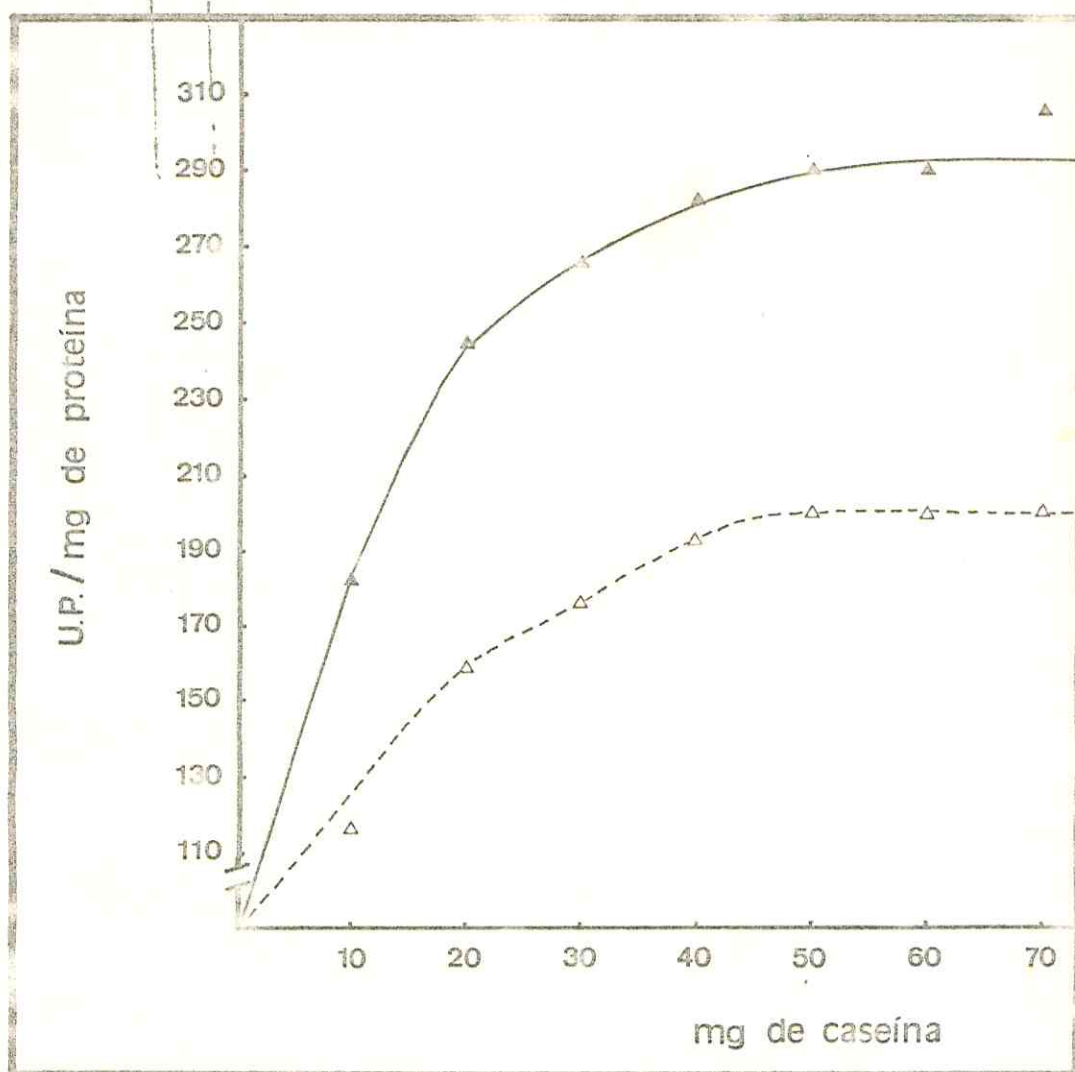


FIGURA 9 - Variação da atividade proteolítica específica do sistema enzimático presente em hepatopâncreas de lagosta do gênero *Panulirus* White, submetido ao fracionamento com sulfato de amônio no intervalo de 20-40 (\blacktriangle — \blacktriangle) e 40-60% (\triangle ---- \triangle) de saturação, em função da concentração de substrato. A reação enzimática foi realizada a 50°C por 60 minutos.

de reação é aproximadamente o dobro para cada 10°C de aumento da temperatura. A velocidade de uma reação química depende da energia de ativação, ou seja, da energia potencial a ser adquirida pelas moléculas para que a reação se desenvolva. Quando a energia de ativação é baixa, as moléculas facilmente atingem o nível necessário, de modo que a reação ocorre muito rapidamente. As enzimas, como catalisadores que são, agem reduzindo a energia de ativação, permitindo assim, que a reação se processe com mais rapidez.

De acordo com ESKIN et al. (1971) a grande maioria das enzimas exibe atividade ótima entre 30 e 40°C . A $45-50^{\circ}\text{C}$ as enzimas começam a experimentar o processo de desnaturação e, em aproximadamente 50°C , ocorre inativação, devido as alterações sofridas pela porção protéica da enzima, a apoenzima, cuja exposição a elevadas temperaturas resulta no desdobramento da molécula e conseqüente perda de especificidade. Normalmente, a inativação térmica ocorre de forma muito rápida em temperaturas superiores a 50°C .

A temperatura ótima é frequentemente citada como uma característica de uma dada enzima. Contudo, isoladamente não é um critério satisfatório para a caracterização de enzimas porque é um valor variável. A temperatura ótima depende do tempo e do pH e, deve ser aplicável somente para certas condições.

A determinação do tempo e temperatura ótimos de reação mostrou que a 50°C durante sessenta minutos o sistema enzimático exibiu máxima atividade em ambas as frações (TABELAS 5 e 6, FIGURAS 10 e 11), razão pela qual foram escolhidos para os enzimáticos.

MAKINODAN & IKEDA (1969), investigando doze espécies de peixe, mencionaram que para quatro horas de reação a temperatura ótima para as proteinases de músculo, ativas em pH alcalino, foi considerada relativamente elevada, $60-65^{\circ}\text{C}$ em comparação com $45-50^{\circ}\text{C}$ para as da faixa ácida. A proteínase alcalina (MAKINODAN & IKEDA, 1969 a) de músculo de carpa, *Cyprinus carpio* demonstrou atividade máxima em cerca de 65°C quando a incubação ocorreu por duas horas e para aquela de caráter ácido, 50°C por uma hora foram os valores

TABELA 5 - Variação da atividade proteolítica do sistema enzimático de hepatopâncreas de lagosta do gênero *Panulirus* White, submetido ao tratamento com sulfato de amônio no intervalo de 20-40% de saturação, em função da temperatura e do tempo de ensaio.

Tempo (minutos)	Temperatura (°C)	
	Atividade proteolítica	
	U.P./mg liofilizado	Específica U.P./mg proteína
	40	
30	14,35	111,27
60	21,36	165,55
90	27,66	214,40
120	33,96	263,25
	50	
30	20,31	157,41
60	32,91	255,11
90	40,61	314,82
120	47,61	369,10
	55	
30	21,71	168,27
60	31,16	241,54
90	36,76	284,97
120	40,61	314,82
	60	
30	17,86	138,41
60	23,81	184,55
90	26,61	206,26
120	29,06	225,26

TABELA 6 - Variação da atividade proteolítica do sistema enzimático de hepatopâncreas de lagosta do gênero *Panulirus* White, submetido ao tratamento com sulfato de amônio no intervalo de 40-60% de saturação, em função da temperatura e do tempo de ensaio.

Tempo (minutos)	Temperatura (°C)	
	Atividade proteolítica	
	U.P./mg liofilizado	Específica U.P./mg de proteína
	40	
30	15,75	83,36
60	23,46	124,11
90	29,76	157,45
120	34,66	183,39
	50	
30	24,16	127,81
60	34,31	181,53
90	44,81	237,10
120	48,31	255,63
	55	
30	22,06	116,70
60	29,41	155,60
90	32,91	174,12
120	36,06	190,80
	60	
30	16,80	83,91
60	21,01	111,14
90	22,76	120,40
120	26,96	142,63

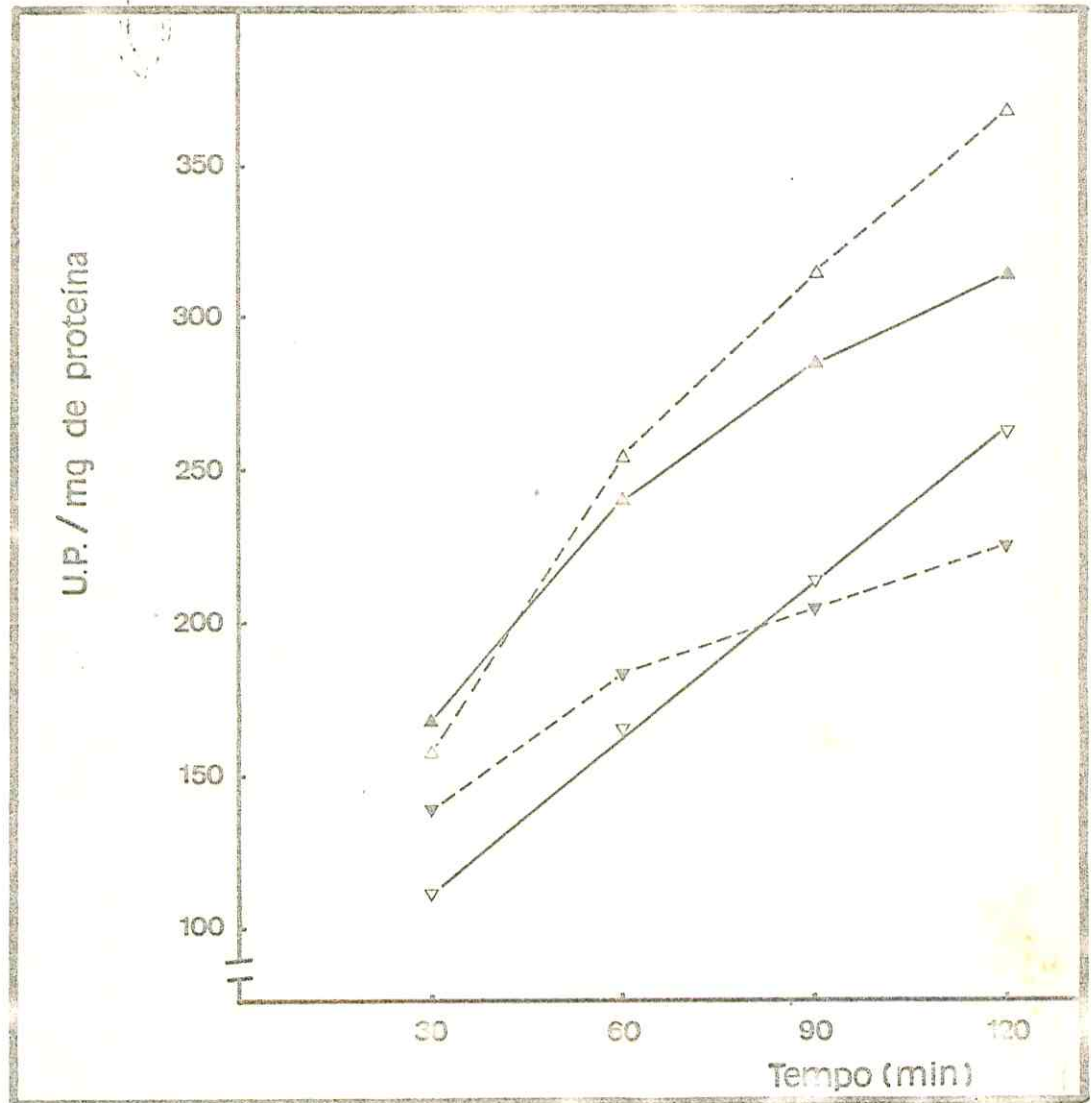


FIGURA 10 - Variação da atividade proteolítica específica do sistema enzimático presente em hepatopâncreas de lagosta do gênero *Panulirus* White, submetido ao fracionamento com sulfato de amônio no intervalo de 20-40% de saturação, em função da temperatura e do tempo de ensaio (40°C ▽—▽ ; 50°C △---△ ; 55°C ▲—▲ ; 60°C ▽---▽).

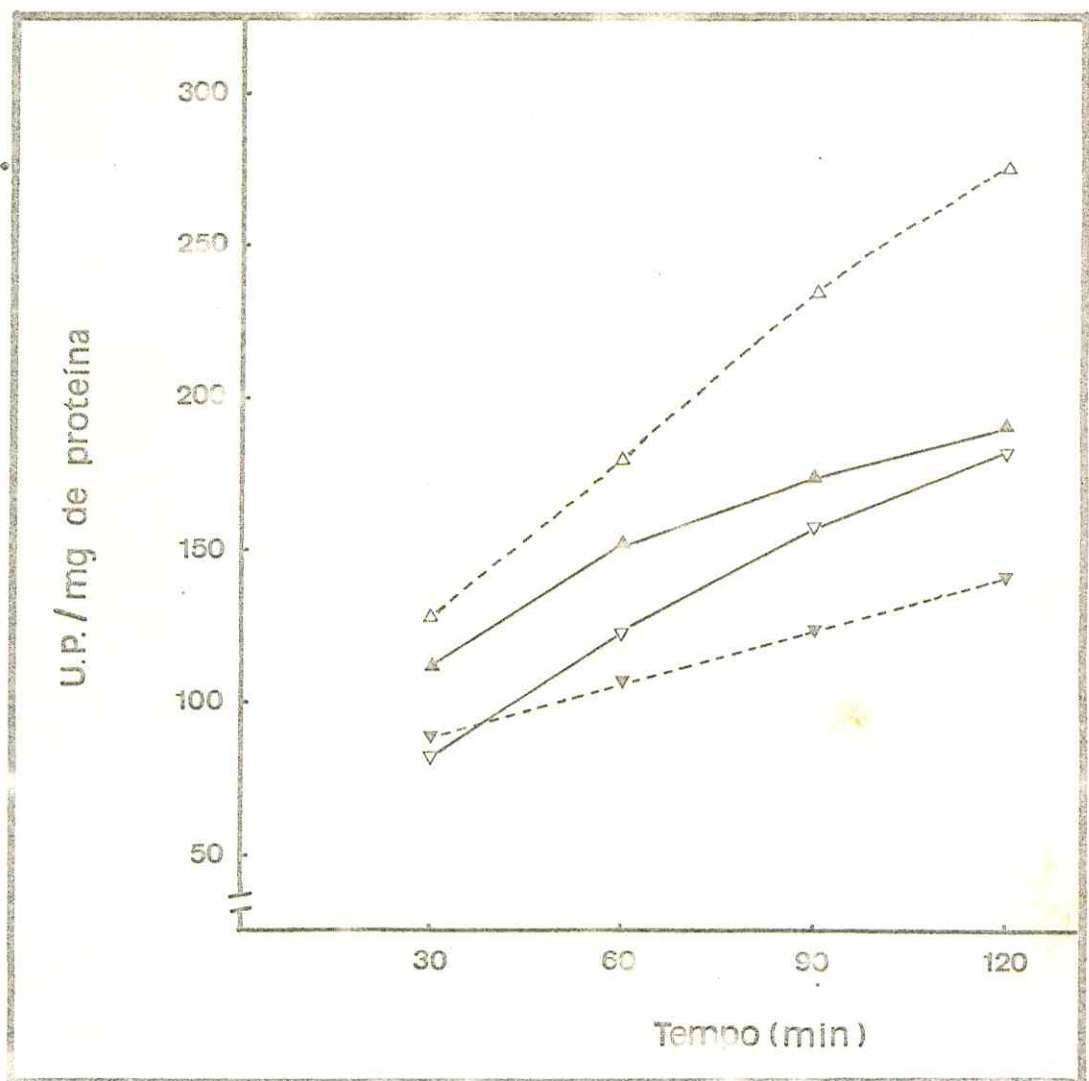


FIGURA 11 - Variação da atividade proteolítica específica do sistema enzimático presente em hepatopâncreas de lagosta do gênero *Panulirus* White, submetido ao fracionamento com sulfato de amônio no intervalo de 40-60% de saturação, em função da temperatura e do tempo de ensaio (40°C ∇—∇ ; 50°C Δ---Δ ; 55°C ▲—▲ ; 60°C ∇---∇).

Ótimos de temperatura e tempo (MAKINODAN & IKEDA, 1969 b). Em músculo de corvina, *Micropogon opercularis* BUSCONI et al. (1984) também encontraram uma temperatura ótima considerada alta, 60°C, ao passo que em músculo de bacalhau, WOJTOWICZ & ODENSE (1970) testemunharam atividade enzimática máxima a 35°C durante uma hora de incubação. A temperatura de 42°C foi considerada aquela onde ocorreu máxima atividade do extrato de músculo de albacora, *Thunnus alalunga* (GRONINGER JR., 1964), e de camarão *Penaeus setiferus* durante quatro horas de incubação (EITENMILLER, 1974).

ERICKSON et al. (1983) ressaltaram que em fluido sarcoplasmático de pescada *Merluccius productus*, a temperatura na qual máxima atividade é observada varia com o tempo de incubação, sendo 65°C por trinta minutos e caindo para 55°C quando o tempo é de sessenta, noventa e cento e vinte minutos.

De acordo com TAKAHASHI et al. (1964 a), as enzimas digestivas da lula *Ommastrephes sloani pacificus* experimentaram máxima atividade caseinolítica em 40°C quando o pH foi igual a 2,5 e em 50°C a pH 6,0. Os extratos hepáticos dos moluscos cefalópodos *Sepia esculenta* e *Octopus vulgaris* apresentaram 30°C (pH 2,5) e 50-55°C (pH 6,0) como temperaturas ótimas, enquanto que para o molusco bivalve *Venerupis philippinarum* a máxima atividade enzimática foi observada em 35°C a pH 6,0 (MAUGLE et al., 1982 a).

As enzimas digestivas presentes em deco pilórico de salmão, *Oncorhynchus tshawytscha* (CROSTON, 1960) exibiram máxima hidrólise de caseína em 49°C durante vinte minutos e em 45°C as estudadas por MURAKAMI & NODA (1981) em sardinha, *Sardinops melanosticta*. Em fígado de várias espécies de peixes, TAKAHASHI et al. (1964 a) afirmaram que a temperatura ótima é geralmente de 40-45°C em pH 2,5 e 50-55°C em pH 6,0 para três horas de reação de hidrólise de caseína, enquanto que para fígado de cangulo, *Balistes vetula*, SIQUEIRA (1986) encontrou máxima atividade proteolítica em 50°C durante sessenta minutos. Em estômago de sardinha, NODA & MURAKAMI (1981) observaram máxima hidrólise de hemoglobina a 55°C em pH 4,0 e a 40°C em pH 2,0. A temperatura ótima de 50-60°C foi aque

la descrita por BENITEZ & TIRO (1982) para os órgãos digestivos do peixe *Chanos chanos* alimentado com alga unicelular e de 45-60°C para o grupo cuja dieta era a base de alga verde filamentosa.

A máxima hidrólise da caseína pelos extratos de estômago, intestino e hepatopâncreas da lagosta *Panulirus japonicus* ocorreu a 50-55°C e entre 40-45°C em pH 11,5 durante três horas de incubação (TAKAHASHI et al., 1964). Da continuidade aos estudos com essa espécie de lagosta TAKAHASHI et al. (1964 a) ratificaram a temperatura de 50-55°C para os pHs 2,5 e 9,0 e de 40-45°C para pH 11,0 em extratos de hepatopâncreas. SAKER et al. (1982) encontraram para jovens da lagosta *Panulirus laevicauda* 50°C por sessenta minutos como os parâmetros ótimos de tempo e temperatura de hidrólise da caseína.

Em suco gástrico do crustáceo *Orconectes virilis*, DEVILLEZ (1965) observou máxima atividade caseinolítica a 49°C com vinte minutos de incubação. A temperatura ótima próxima a 50°C parece ser uma função do método de digestão da caseína, embora SIZER apud DEVILLEZ (1965) tenha considerado que esse valor de temperatura é de pouca significância na caracterização de uma enzima.

Estudos realizados com enzimas proteolíticas de hepatopâncreas de camarão têm demonstrado que a hidrólise máxima da caseína ocorreu a 49°C em *Penaeus setiferus* (GATES & TRAVIS, 1969) e a 55°C com sessenta minutos de incubação em *Trachypenaeus curvirostris* (ASAHARA, 1973). As enzimas digestivas de *Penaeus japonicus* (MAUGLE et al., 1982) e de *Penaeus kerathurus* (GALGANI et al., 1984) apresentaram 40°C e 50°C, respectivamente, como sendo as melhores temperaturas para uma incubação de trinta minutos. Em *Parahaliporus sibogae*, MURAMATSU & KAKIUCHI (1978) observaram atividade proteolítica máxima a 37°C com quinze minutos de incubação. Outros crustáceos decápodos estudados por SATHER (1969) exibiram a mesma temperatura ótima, mas para uma incubação de quatro horas.

MAYZAUD & MAYZAUD (1981) e HARA et al. (1984 a) inves

tigaram as enzimas digestivas de copêpodo, *Acartia hudsonica*, *Eurytemora herdmanni*, *Oithona similis*, *Podon* sp. e rotífero *Brachionus plicatilis* e encontraram máxima atividade em 45°C por quarenta e cinco minutos e em 37°C por sessenta minutos, respectivamente.

LIN et al. (1980), caracterizando as proteases de origem muscular e renal de corvina com substratos marcados com isótopo radioativo (^{14}C), observaram máxima atividade das proteases alcalinas quando o ensaio enzimático era procedido em 45°C por sessenta minutos e DRUCKER (1972) também usando caseína marcada radioativamente, encontrou atividade proteolítica máxima em 37°C quando a incubação ocorreu durante trinta minutos.

4.6 - Termoestabilidade

O efeito da temperatura sobre a atividade enzimática tem sido considerado de grande valia principalmente por dar condições de se avaliar o grau de vulnerabilidade de enzimas quando submetidas ao calor. Esta importante característica tem sido referida como termoestabilidade. As enzimas são usualmente inativadas pelo aquecimento a 70°C ou mais, por poucos minutos. De um modo geral, um aumento na temperatura provoca acréscimo da atividade enzimática até atingir um tempo onde a desnaturação ocorre.

A termoestabilidade do sistema enzimático (TABELA 7, FIGURAS 12 e 13) revelou que a 40°C há uma ativação enzimática mesmo após decorridos sessenta minutos de incubação. As frações 20-40 e 40-60% de saturação com sulfato de amônio exibiram uma perda da ordem de 35 a 37% da atividade inicial após sessenta minutos de exposição a 50°C, ao passo que os extratos submetidos a 60°C perderam, em média, 77% da atividade original com apenas quinze minutos de aquecimento. Esta propriedade inerente ao sistema enzimático de hepatopâncreas de lagosta confere uma certa margem de segurança no

TABELA 7 - Variação percentual da atividade proteolítica específica do sistema enzimático de hepatopâncreas de lagosta do gênero *Panulínus* White, submetido ao fracionamento com sulfato de amônio nos intervalos de 20-40 e 40-60% de saturação e pré-incubado a 40, 50 e 60°C, em função do tempo.

Tempo de exposição (minutos)	Fração					
	20/40			40/60		
	Ativ. proteolítica			Ativ. proteolítica		
	U.P./mg liofilizado	Específica U.P./mg proteína	% de atividade	U.P./mg liofilizado	Específica U.P./mg proteína	% de atividade
	Temperatura (°C)					
	40					
0	38,51	298,53	100,0	41,67	220,45	100,0
15	33,51	298,53	100,0	41,44	222,87	101,1
30	31,64	307,26	102,9	48,19	255,00	115,7
45	39,64	307,26	102,9	48,65	257,38	116,8
60	39,19	303,77	101,8	47,74	252,62	114,6
	50					
0	38,51	298,53	100,0	41,67	220,45	100,0
15	33,56	260,13	87,1	34,8	182,31	82,7
30	29,50	228,70	76,6	31,53	166,82	75,7
45	27,70	214,74	71,9	27,43	145,37	65,9
60	25,50	193,79	64,9	26,55	139,42	63,2
	60					
0	38,51	298,53	100,0	41,67	220,45	100,0
15	9,46	73,32	24,6	9,01	47,67	21,6
30	9,01	69,83	23,4	7,76	35,75	16,2
45	7,21	55,87	18,7	6,31	33,36	15,1
60	6,53	50,63	17,0	5,63	29,79	13,5

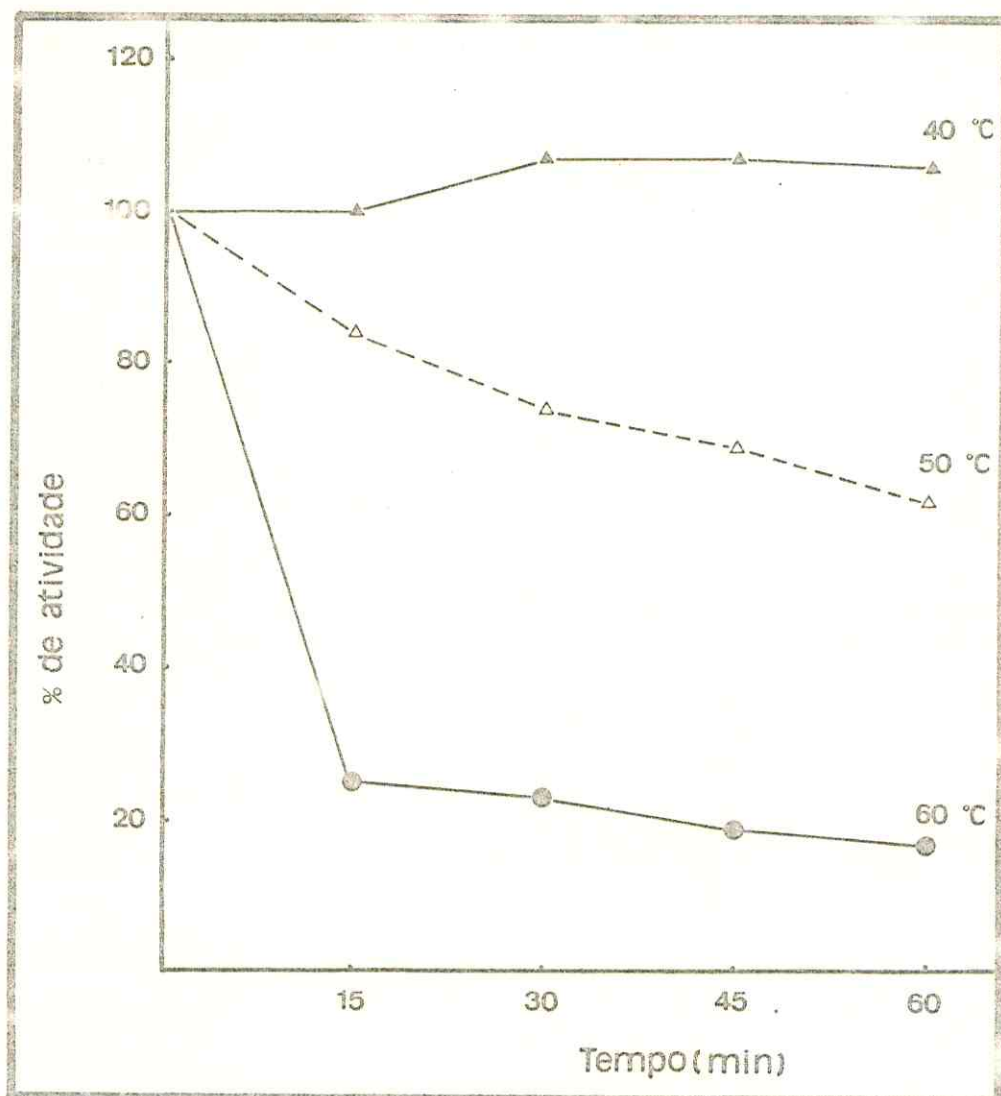


FIGURA 12 - Variação percentual da atividade proteolítica específica do sistema enzimático presente em hepatopâncreas de lagosta do gênero *Panulirus* White, submetido ao fracionamento com sulfato de amônio no intervalo de 20-40% de saturação e pré-incubação a 40 (\triangle — \triangle), 50 (\triangle --- \triangle) e 60°C (\bullet — \bullet), em função do tempo.

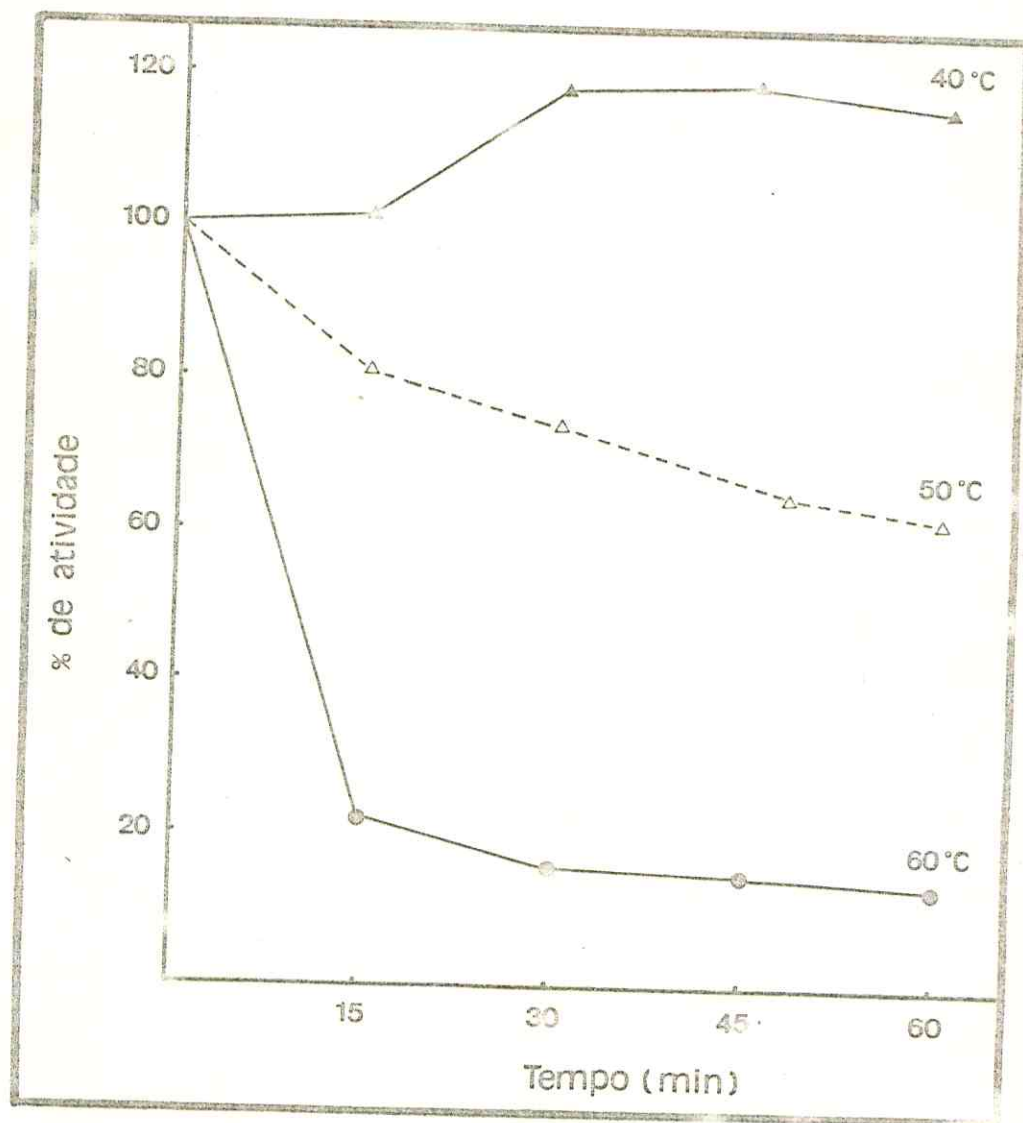


FIGURA 13 - Variação percentual da atividade proteolítica específica do sistema enzimático presente em hepatopâncreas de lagosta do gênero *Panulirus* White, submetido ao fracionamento com sulfato de amônio no intervalo de 40-60% de saturação e pré-incubação a 40 (\blacktriangle — \blacktriangle), 50 (\triangle --- \triangle) e 60°C (\bullet — \bullet), em função do tempo.

decorrer da preparação e manuseio do extrato enzimático, sem oferecer grandes riscos de inativação.

Nos extratos de músculo de carpa *Cyprinus carpio*, bruto e tratado com sulfato de amônio, MAKINODAN & IKEDA (1969 a) mostraram que as proteinases ativas em pH alcalino foram estáveis a 65°C por dez minutos, embora a 70°C a perda registrada no extrato bruto tenha sido da ordem de 50%. O extrato tratado com sulfato de amônio sofreu redução de 30% na atividade quando aquecido a 60°C e aproximadamente 80% quando colocado a 65°C durante trinta minutos. A fração eluída em Sephadex G-200 perdeu somente cerca de 20% da atividade depois de submetida a 60°C por dez minutos e, mesmo após sessenta minutos, a redução foi da ordem de 40%. Entretanto, a 65°C por quarenta minutos e a 70°C por dez minutos, a atividade foi quase completamente perdida. De modo contrário, as proteinases ativas em pH ácido parecem menos estáveis ao calor, tendo experimentado inativação quase total pelo aquecimento a 55°C durante dez minutos (MAKINODAN & IKEDA, 1969 b).

Para avaliar a importância relativa das diferentes proteases durante o processamento a quente, LIN et al. (1980) encontraram que cerca da metade da atividade da protease ácida oriunda de extratos de músculo e rim foi perdida quando incubada a 60°C por vinte minutos. De maneira curiosa, somente 15% da atividade da protease alcalina de músculo foi perdida, ao passo que para aquela de origem renal a perda foi de 30%. A 70°C, a maior parte da atividade da protease ácida foi perdida, enquanto que a da protease alcalina de músculo e rim ainda ficou com 27% e 12% da atividade inicial, respectivamente.

A atividade proteolítica remanescente após a pré-incubação a 55°C foi da ordem de 65, 42 e 32% para as enzimas alcalinas de ceco pilórico de sardinha denominadas I, II e III, respectivamente, depois de decorridos cinco minutos (MURAKAMI & NODA, 1981). Segundo JÔNÁS et al. (1983) os ensaios realizados a 55°C indicaram que, após 14,6; 3,8 e 1,3 minutos de incubação, há perda de 50% da atividade em *Silurus*

glanis, *Hypophthalmichthys molitrix* e *Cyprinus carpio*, respectivamente. Igual percentagem de perda foi registrada quando a enzima de rotífero, *Brachionus plicatilis*, F-I foi incubada a 45°C por duas horas, enquanto que para a F-II a temperatura de 40°C durante dez minutos foi suficiente para promover o mesmo índice de inativação enzimática tendo como referência a atividade inicial (HARA et al., 1984). No músculo esquelético de corvina, *Micropogon opercularis* a atividade registrada para a protease alcalina I a 37°C foi somente 25% da atividade observada a 60°C, ao passo que a protease II, nessas condições, é completamente inativa (BUSCONI et al., 1984).

A enzima estudada em músculo de camarão *Penaeus setiferus* por EITENMILLER (1974) foi completamente inativada com dez minutos de exposição a 50°C, sendo classificada como termolábil, vez que a perda de atividade ocorreu de modo muito rápido em temperaturas superiores àquela considerada ótima. A enzima proteolítica encontrada em hepatopâncreas de camarão *Parahaliporus sibogae* por MURAKAMI & KAKIUCHI (1978) perdeu quase 50% da sua atividade quando a incubação ocorreu a 50°C, por quinze minutos. De modo contrário, o sistema enzimático do mesmo órgão de jovens de lagosta *Panulirus laevicauda* foi estável às temperaturas de 40 e 50°C, tendo perdido cerca de 84% da atividade original somente quando submetido a 60°C por sessenta minutos (SAKER et al., 1982). Também muito estável ao calor foi a enzima estudada em hemo linfa de lagosta por VIEIRA et al. (1985) que, mesmo depois de sessenta minutos a 60°C, ainda apresentou 75% da atividade de inicial.

4.7 - Ativadores/inibidores

A maioria das enzimas pode sofrer alteração em sua atividade quando em contato com certos reagentes químicos, os quais podem ativar ou inibir a velocidade de reação.

Além da enzima e do substrato, outras substâncias podem ser necessárias para a completa atividade enzimática. Estas são denominadas cofatores e catalisam a reação de degradação da enzima, sendo classificadas em dois grupos: as coenzimas específicas, compostos orgânicos de baixo peso molecular e estrutura complexa que, em geral, participam da reação transportando determinados grupos químicos; e os ativadores, em geral íons inorgânicos que levam à formação do complexo ativado sem participarem da reação. Pertencem a este grupo, os cátions: Na^+ , K^+ , Rb^+ , Cs^+ , Mg^{2+} , Ca^{2+} , Zn^{2+} , Cd^{2+} , Cr^{3+} , Cu^{2+} , Mn^{2+} , Fe^{2+} , Co^{2+} , Ni^{2+} , Al^{3+} e NH_4^+ . O número atômico situado entre 11 e 50 leva a crer que um dos fatores que determinam a ação ativadora seja o tamanho do íon. O principal ânion é o cloreto e, a relação entre a atividade enzimática e valência está indicada pelo fato de que somente os íons monovalentes são ativos. Íons lipofílicos carregados negativamente também ativam determinadas enzimas em reações com moléculas neutras insolúveis em água (BOBBIO & BOBBIO, 1985).

Alguns compostos denominados inibidores têm a capacidade de se combinar, de modo reversível, com determinadas enzimas, inibindo sua ação. Estas podem ser inativadas por modificações irreversíveis em algum grupo funcional essencial para atividade catalítica. Elas também podem ser inibidas reversivelmente de forma competitiva ou não-competitiva. Os inibidores competitivos, geralmente de estrutura semelhante à do substrato, competem reversivelmente com ele pela ligação no sítio ativo, mas eles não são transformados pela enzima. Os inibidores não-competitivos ligam-se a algum outro sítio da enzima livre ou do complexo enzima-substrato; a ação deles não pode ser revertida pelo substrato (LEHNINGER, 1985).

O comportamento do sistema enzimático presente em hepatopâncreas de lagosta, frente a onze reagentes químicos, está registrado na TABELA 8. Na fração 20-40%, o cloreto de mercúrio (HgCl_2), o etilenodiaminotetracético (EDTA) e o tiosulfato de sódio ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \cdot 5 \text{H}_2\text{O}$) na concentração de

TABELA 8 - Dados relativos a ação de compostos químicos, com concentração igual a 1 m*M*, sobre a atividade proteolítica específica do sistema enzimático de Papatopâncreas de lagosta do gênero *Panulirus* White, nas frações obtidas pelo fracionamento com sulfato de amônio no intervalo de 20-40 e 40-60% de saturação.

Compostos químicos (1 m <i>M</i>)	Fração					
	20/40			40/60		
	Atividade proteolítica			Atividade proteolítica		
U.P./mg liofiliz zado	Específica U.P./mg proteína	% de atividade	U.P./mg liofiliz zado	Específica U.P./mg proteína	% de atividade	
Controle	38,51	298,53	100,0	41,67	220,45	100,00
$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	39,86	309,01	103,5	38,29	202,57	91,9
HgCl_2	15,31	118,72	39,8	14,64	77,45	35,1
NaCl	36,93	286,31	95,9	40,54	214,49	97,3
$\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	36,03	279,33	93,6	17,12	90,56	41,1
EDTA	22,97	178,07	59,7	25,22	133,46	60,5
$\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	37,84	293,30	98,3	32,66	172,78	78,4
$\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	34,23	265,36	88,9	45,04	238,32	108,1
Ácido ascórbico	37,39	289,81	97,1	54,05	285,98	129,7
Ácido cítrico	37,39	289,81	97,1	35,58	188,27	85,4
2-mercaptoetanol	35,58	275,84	92,4	36,93	195,42	88,7
$\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$	42,34	328,21	09,9	55,18	291,94	132,4

1 mM provocaram uma inibição da ordem 60, 40 e 11%, respectivamente com relação ao valor inicial de atividade. Os demais compostos podem ser considerados sem influência sobre o sistema enzimático, todos na concentração de 1 mM, exceto o bissulfito de sódio ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$) que provocou uma ativação da ordem de 10%.

A fração 40-60% de saturação foi ativada pelo tiosulfato de sódio ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \cdot 5 \text{H}_2\text{O}$), ácido ascórbico ($\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_6$) e bissulfito de sódio ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$) a 1 mM nos seguintes níveis percentuais: 8, 30 e 32%, respectivamente. Por outro lado, o cloreto de mercúrio (HgCl_2), cloreto de ferro III ($\text{FeCl}_3 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$), etilenodiaminotetracético (EDTA), cloreto de manganês ($\text{MnCl}_2 \cdot 4 \text{H}_2\text{O}$), ácido cítrico ($\text{H}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7$) e 2-mercaptoetanol ($\text{HSCH}_2\text{CH}_2\text{OH}$) inibiram fortemente a atividade. Os outros reagentes empregados parecem não alterar a atividade observada para o controle, quando nenhum composto é adicionado (TABELA 8).

A enzima do intestino do peixe *Etroplus suratensis* não foi afetada pelos íons metálicos Hg^{2+} , Mg^{2+} , Co^{2+} , Cu^{2+} e Ca^{2+} mesmo quando a concentração foi igual a 1 mM. Os íons Mn^{2+} ativaram a enzima, ao passo que os Fe^{3+} e Zn^{2+} promoveram leve inibição (SUNDARAM & SARMA, 1960). A proteinase ácida de músculo de carpa foi ativada em 73% pela adição de 2-mercaptoetanol a 1 mM. O EDTA na mesma concentração não alterou a ação enzimática (MAKINODAN & IKEDA, 1969 b). BROCKERHOFF et al. (1970) também encontraram que o EDTA não exerceu nenhum efeito ativador ou inibidor na enzima de suco gástrico da lagosta *Homarus americanus*. A proteinase de hepatopâncreas de camarão *Trachypenaeus curvirostris* foi levemente ativada pelos íons Mn^{2+} , Mg^{2+} , Li^+ e Ca^{2+} e fortemente inibida pelos íons Fe^{2+} , Fe^{3+} , Hg^{2+} e Pb^{4+} . O tiosulfato de sódio e a hidroquinona ativaram a enzima, enquanto o 2-mercaptoetanol, ácido ascórbico, ácido cítrico e EDTA inibiram a atividade em 83, 68, 87 e 47%, respectivamente (ASAHARA, 1973). Em músculo de lula *Ommastrephes sloani pacificus*, a proteinase ativa em pH 3,1 experimentou incremento em sua atividade de com a adição de EDTA (SAKAI & MATSUMOTO, 1981).

O único íon metálico requerido para a ativação da protease do camarão *Penaeus japonicus*, segundo MAUGLE et al. (1982), foi o Fe^{2+} , tendo sido inibida por Ag^{2+} , Ca^{2+} , Cu^{2+} e Cd^{2+} e quase completamente por Hg^{2+} , cujo potencial de atividade caiu para 12%. A adição de $\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_6$, $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$, $\text{HSCH}_2\text{CH}_2\text{OH}$, $\text{H}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7$, EDTA MnCl_2 e NaCl não alterou de modo significativa a atividade proteolítica. MAUGLE et al. (1982 a) observaram que os compostos $\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_6$ e CaCl_2 e 1mM praticamente não modificaram a atividade proteolítica, enquanto EDTA e HgCl_2 a 1 mM reduziram a atividade em 22 e 46%, respectivamente.

YOSHINAKA et al. (1984) mostraram que os íons divalentes de cobalto, ferro e cobre inibiram fortemente a enzima pancreática de *Parasilurus asotus* e os de manganês e níquel somente de forma moderada. Por outro lado, os íons de zinco, magnésio e cálcio não apresentaram efeito inibidor. Os íons metálicos não afetaram a atividade enzimática estudada em camarão *Penaeus kerathurus* por GALGANI et al. (1984), exceto no caso do Cu^{2+} que deixou uma atividade residual de 70%. Entretanto, o sistema enzimático de rotífero *Brachionus plicatilis* foi marcadamente inativado quando houve adição de Hg^{2+} , Ag^{2+} e Cu^{2+} (HARA et al., 1984 a).

MURAMATSU & KAKIUCHI (1978) encontraram que a inibição da atividade da enzima de hepatopâncreas de camarão *Parahaliporus sibogae* foi da ordem de 49 e 58%, quando foram utilizados FeCl_3 e $\text{Hg}(\text{CH}_3\text{COO})_2$, respectivamente. Não se observou alterações na atividade pela adição de CaCl_2 , MnCl_2 , $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$, EDTA e 2-mercaptoetanol a 1mM. BUSCONI et al. (1984) mostraram que o EDTA e 2-mercaptoetanol a 10 mM inibiram a atividade da protease I de músculo de corvina em 55 e 75%, respectivamente, ao passo que a protease II experimentou a ativação por ambos os compostos. As duas enzimas tiveram suas atividades reduzidas em diferentes graus de acordo com a concentração de NaCl . Uma inibição de 50% foi observada com 250 mM e 450 mM para as proteases I e II, respectivamente.

As proteases digestivas I, II e III de sardinha não

sofreram qualquer tipo de alteração na presença de agentes quelantes de metais e reagentes sulfidrilas, entretanto elas foram fortemente inibidas pelo diisopropil fluorofosfato (DEP). O inibidor de tripsina presente na soja não afetou a enzima I, porém inibiu a atividade das demais (MURAKAMI & NODA, 1981). GRONINGER Jr. (1964) observou que a atividade proteolítica registrada em músculo de albacora também não foi modificada pelo inibidor de tripsina da soja e ovoalbumina a 0,01% nem pelo DEP a 10 mM. Contudo, o p-cloromercu-riobenzoato (p-CMB), iodoacetamida e N-metilmaleimida a 1,4 mM inibiram a atividade enzimática em 40, 20 e 20%, respectivamente. CROSTON (1960) verificou que a atividade das endopeptidases de ceco pilórico de salmão foi inibida pelo inibidor de tripsina presente na soja de forma semelhante àquela que ocorre nos mamíferos.

CÁNOVAS & MAS (1987) desenvolveram um trabalho para avaliar a ação tóxica do Cd^{2+} sobre uma enzima oriunda do fígado e baço de alevino de *Liza aurata*. Com uma concentração subletal de 600 ppb eles observaram uma ligeira diminuição na atividade enzimática, provavelmente devido a processos anêmicos ou degenerativos produzidos nos tecidos de animais expostos a tal concentração de íons de cádmio.

4.8 - Cromatografia em Sephadex G-100

Desde a sua introdução há 20 anos, a filtração em gel de Sephadex tem ocupado uma posição de destaque na purificação de milhares de compostos como enzimas, polissacarídeos, ácidos nucleicos, proteínas e outras macromoléculas biológicas.

Muitos autores têm utilizado esse processo de purificação, embora os tipos de gel sejam diferentes e empregados de acordo com o material que se trabalha e com o grau de separação que se deseja atingir (ANDREWS, 1964; GRONINGER JR., 1964; FOLK & SCHIRMER, 1965; GATES & TRAVIS, 1969; MAKINODAN & IKEDA, 1969 a e 1969 b; DE HAËN et al., 1977;

MURAKAMI & NODA, 1981; JÓNÁS et al., 1983; TITANI, et al., 1983; VO et al., 1983; YOSHINAKA et al., 1983; HARA et al., 1984 e 1984 a).

A fração 20/40 submetida a filtração em gel de Sephadex G-100 (FIGURA 14) em tampão fosfato 0,01 M contendo cloreto de sódio 0,1 M pH 7,0, apresentou três picos (I, II e III) cujas massas moleculares foram estimadas em 124.000, 34.000 e 6.000 daltons, respectivamente.

Os efluentes da coluna foram testados para a atividade proteolítica (pH 8,0), mostrando-se que provavelmente duas enzimas estão presentes em hepatopâncreas de lagosta do gênero *Panulirus* White.

4.9 - Comparação com enzimas comerciais

A atividade proteolítica registrada para o sistema enzimático presente em hepatopâncreas de lagosta exibiu valores comparáveis àqueles verificados para as proteases comerciais A, B e C. Entretanto, devido ao baixo grau de purificação em que o sistema enzimático de lagosta se encontra, os valores de proteína foram maiores do que nas outras proteases, cujo estado de purificação é extremamente mais elevado. Contudo, o sistema enzimático de hepatopâncreas de lagosta apresenta grandes possibilidades de experimentar um incremento significativo na atividade proteolítica específica ao ser submetido a processos mais sofisticados de purificação.

Na TABELA 9 estão apresentados os teores de proteína e atividade proteolítica específica de três proteases encontradas no comércio e com aplicação industrial, comparados com aqueles encontrados para o sistema enzimático de hepatopâncreas de lagosta, submetido ao fracionamento com sulfato de amônio, nos intervalos de 20-40, 40-60 e 20-60% de saturação e da fração 20-40% eluída em Sephadex G-100.

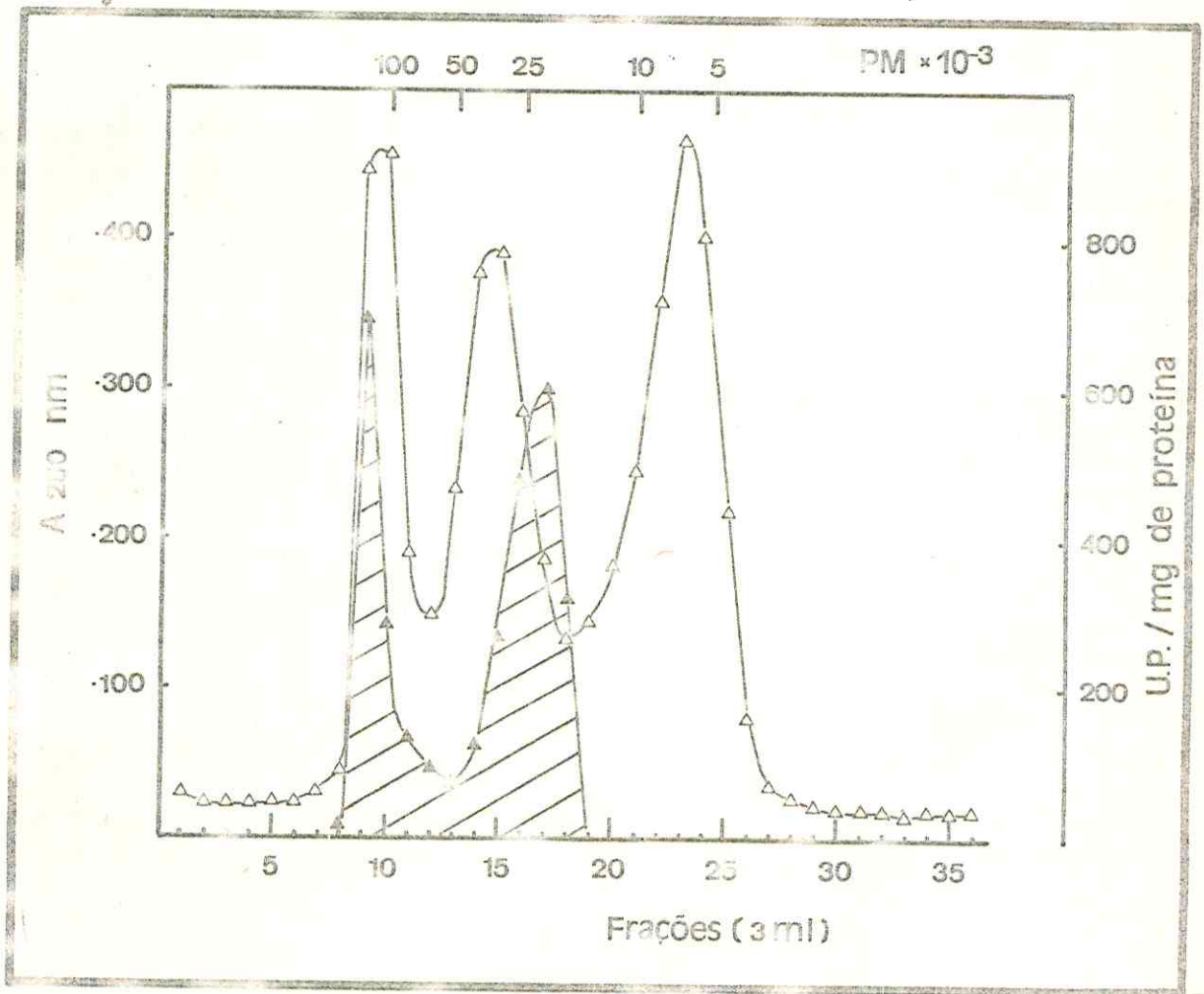


FIGURA 14 - Filtração em gel de Sephadex G-100 da fração obtida por precipitação do extrato de hepatopâncreas de lagosta do gênero *Panulirus* White com sulfato de amônio no intervalo de 20-40% de saturação.

TABELA 9 - Dados comparativos do teor de proteína e atividade proteolítica específica de proteases comerciais e do sistema enzimático de hepatopâncreas de lagosta do gênero *Panulirus* White.

Especificação	Proteína (mg/mg liofilizado)	Atividade proteolítica	
		(U.P./mg liofilizado)	Específica (U.P./mg proteína)
Enzimas comerciais			
A	0,221	56,02	253,47
B	0,060	26,84	447,35
C	0,076	23,34	307,11
Hepatopâncreas de lagosta			
20-40% $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	0,129	38,51	298,53
40-60% $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	0,189	41,67	220,45
20-60% $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	0,831	265,80	319,86
20-40% Sephadex G-100 - tubo 17	0,089	53,34	599,28

O fracionamento com sulfato de amônio, que resultou na obtenção da fração 20-60%, foi importante porque permitiu a concentração do material, embora não tenha aumentado a atividade específica de modo significativo.

Como resultado dos parâmetros ótimos para caracterizar as proteases comerciais foram encontrados: pH igual a 8,5, tempo de sessenta minutos e temperatura de 40°C e 50mg de caseína para 0,2 ml do extrato preparado pela dissolução de 2 mg de proteases em 1 ml de tampão.

A enzima proteolítica de ceco pilórico de peixe *Katsuwonus pelamis* foi comparada por TAKAHASHI et al. (1984) com outras três proteases comerciais com relação à taxa de hidrólise do músculo vermelho do mesmo animal. Com base nesse estudo, eles encontraram que a taxa de solubilidade da proteína de músculo vermelho era mais reduzida ao se utilizar a protease de ceco pilórico, quando comparada com as enzimas testadas e disponíveis no mercado.

5 - CONCLUSÕES

1 - O sistema enzimático de hepatopâncreas de lagosta apresentou máxima atividade proteolítica específica em pH 8,0, usando a caseína a 1% como substrato.

2 - A temperatura ótima foi 50°C, com o tempo de incubação da mistura de reação igual a sessenta minutos.

3 - Para a relação enzima-substrato ficou estabelecida a razão de 50 mg de caseína para 0,5 ml do extrato preparado pela dissolução de 1 mg de liofilizado em 3 ml do tampão fosfato, 0,01 M contendo cloreto de sódio 0,1M pH 7,0.

4 - O sistema enzimático foi ligeiramente ativado a 40°C, mesmo depois de sessenta minutos de incubação do extrato. A 50°C por sessenta minutos, a perda foi de 35 a 37% da atividade original, mas com quinze minutos a 60°C a atividade inicial diminuiu cerca de 77%.

5 - As frações obtidas pelo fracionamento com sulfato de amônio no intervalo de 20-40 e 40-60% de saturação foram aquelas que revelaram maior atividade proteolítica específica, aumentando a atividade inicial em 2,5 e 1,8 vezes, correspondendo a uma recuperação de 9,4 e 13,7%, respectivamente.

6 - A fração 20/40 experimentou inibição de sua atividade pelo cloreto de mercúrio (HgCl_2), etilenodiaminotetracético (EDTA) e tiosulfato de sódio ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \cdot 5 \text{H}_2\text{O}$) a 1 mM.

7 - A fração 40/60 foi ativada quando em contato com tiosulfato de sódio ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \cdot 5 \text{H}_2\text{O}$), ácido ascórbico ($\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_6$) e bissulfito de sódio ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$) a 1 mM, sendo inibida pelo cloreto de mercúrio (HgCl_2), cloreto de ferro III ($\text{FeCl}_3 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$), etilenodiaminotetracético (EDTA) e cloreto de manganês ($\text{MnCl}_2 \cdot 4 \text{H}_2\text{O}$), ácido cítrico ($\text{H}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7$) e 2-mercaptoetanol ($\text{HSCH}_2\text{CH}_2\text{OH}$) a 1 mM.

8- A filtração em gel de Sephadex G-100 da fração 20/40 permitiu a observação de duas enzimas cujas massas moleculares foram estimadas em 124.000 e 34.000 daltons.

6 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AINOUZ, I.L.; BENEVIDES, N.B. & FREITAS, A.L.P. - Proteolytic activities in seeds of *Vigna unguiculata*(L.) Walp. Biol. Plant., 23 (2): 133-140, 1981.
- AINOUZ, I.L.; XAVIER-FILHO, J. & GOMES-FILHO, E. - Atividade proteolítica em sementes de *Vigna sinensis* seridõ. Ciênc. Cult., 24:104, 1972.
- ANDREWS, P. - Estimation of the molecular weights of proteins by Sephadex gel-filtration. Biochem. J., 91: 222-233, 1964.
- ARCHER, M.C.; RAGNARSSON, J. O.; TANNENBAUM, S.R. & WANG, D.I.C. - Enzymatic solubilization of an insoluble substrate, fish protein concentrate: process and kinetic considerations. Biotechn. Bioengi. XV: 181-196, 1973.
- ARMSTRONG, J.R. & DEVILLEZ, E.J. - Proteases of low molecular weight in the digestive fluids of decapods. Can. J. Zool., 56: 2225-2229, 1978.
- ASAHARA, M. - Studies on proteolytic enzyme in the liver of shrimp, *Trachypenaeus curvirostris*. Bull. Japan. Soc. Sci. Fish., 39 (9): 987-991, 1973.
- ASGHAR, A. & BHATTI, A.R. - Endogenous proteolytic enzymes in skeletal muscle: their significance in muscle physiology and during postmortem aging events in carcasses. In: Advances in food research. Vol. 31. C. O. Chichester; E. M. Mrak & B.S. Schweigert (eds.). Academic Press, 1987. p. 343-451.

- BASTOS, J. R.; ALVES, T.T.; VIEIRA, G.H.F.; PRICE, H. L. & PINHEIRO, P.A. - Obtenção de farinha e solúvel do cefalo tórax de lagostas. Arq. Ciên. Mar., 11(2): 95-98, 1971.
- BAUER, B. A. & EITENMILLER, R.R. - A study of some kinetic properties of partially purified *Penaeus setiferus* arylamidase. J. Food Sci., 39: 10-14, 1974.
- BENDER, M.L. & KÉZDY, F.J. - Mechanism of action of proteolytic enzymes. Ann. Rev. Biochem., 34: 49-76, 1965.
- BENITEZ, L. V. & TIRO, L. B. - Studies on the digestive proteases of the milkfish *Chanos chanos*. Mar. Biol., 71: 309-315, 1982.
- BERTULLO, V.H. - Informacion sobre Bio Proteo Catenolizado (BPC) para conocimiento medico. S.R.L. (ed.) p. 1 - 18, 1986.
- BOBBIO, F.O. & BOBBIO, P.A. - Introdução à Química de Alimentos. Fundação Cargill. Campinas, 1985. XV + 306 p., ilustr.
- BRADSHAW, R.A.; NEURATH, H.; TYE, R.W.; WALSH, K.A. & WINTER, W.P. - Comparison of the partial amino-acid sequence of dogfish trypsinogen with bovine trypsinogen. Nature, 226: 237-239, 1970.
- BROCKERHOFF, H.; HOYLE, R. J. & HWANG, P. C. - Digestive enzymes of the American lobster (*Homarus americanus*). J. Fish. Res. Bd. Can., 27(8): 1357-1370, 1970.
- BRUN, G.L. & WOJTOWICZ, M.B. - A comparative study of the digestive enzymes in the hepatopancreas of Jonah crab (*Cancer borealis*) and Rock crab (*Cancer irroratus*). Comp. Biochem. Physiol., 53 B: 387-391, 1976.
- BUSCONI, L.; FOLCO, E. J.; MARTONE, C.; TRUCCO, R. E. & SÁNCHEZ, J.J. - Identification of two alkaline proteases and a trypsin inhibitor from muscle of white croaker (*Micropogon opercularis*). Febs Letters, 176(1): 211-214, 1984.

- CÁNOVAS, M. & MAS, J. - Efecto del ion Cd^{+2} sobre el enzima d-Aminolevulinato deshidratase de hígado y bazo de alevín de mújol. *Liza aurata* (Risso). Bol. Inst. Esp. Oceanogr., 4 (1): 29-32, 1987.
- CHARNEY, J. & TOMARELLI, R.M. - A colorimetric method for the determination of the proteolytic activity of duodenal juice. J. Biol. Chem., 171: 501-505, 1947.
- COHEN, T.; GERTLER, A. & BIRK, Y. - Pancreatic proteolytic enzymes from carp (*Cyprinus carpio*) - I. Purification and physical properties of trypsin, chymotrypsin, elastase and carboxypeptidase B. Comp. Biochem. Physiol., 69 B: 639-646, 1981.
- COHEN, T.; GERTLER, A. & BIRK, Y. - Pancreatic proteolytic enzymes from carp (*Cyprinus carpio*) - II. Kinetic properties and inhibition studies of trypsin, chymotrypsin and elastase. Comp. Biochem. Physiol., 69 B: 647-653, 1981 a.
- CORREA, J. U.; RODRIGUES, V. & LODI, W. R. - Proteases of *Blastocladiella emersonii*: Developmental patterns and sensitivity to inhibitors in vitro and in vivo. Morphogenetic events, 127-130, s.d.
- CROSTON, C. B. - Tryptic enzymes of chinook salmon. Arch. Biochem. Biophys., 89: 202-206, 1960.
- CROSTON, C.B. -Endopeptidases of salmon ceca: chromatographic separation and some properties. Arch. Biochem. Biophys., 112: 218-223, 1965.
- DABROWSKI, K. & GLOGOWSKI, J. - Studies on the role of exogenous proteolytic enzymes in digestion processes in fish. Hydrobiol., 54(2): 129-134, 1977.
- DAWSON, R.M.C.; ELLIOT, D.C.; ELLIOT, W.H. & JONES, K.M. - Data for Biochemical Research. 2. ed. Oxford University Press, XV + 654 pp., 1969.

- DE HAËN, C. & GERTLER, A. - Isolation and amino-terminal sequence analysis of two dissimilar pancreatic proelastases from the African lungfish, *Protopterus aethiopicus* Biochem., 13 (13): 2673-2677, 1974.
- DE HAËN, C.; WALSH, K.A. & NEURATH, H. - Isolation and amino-terminal sequence analysis of a new pancreatic trypsinogen of the African lungfish *Protopterus aethiopicus*. Biochem., 16 (20): 4421-4425, 1977.
- DE LA HABA, G.; CAMMARATA, P.S. & TIMASHEFF, S. N. - The partial purification and some physical properties of cathepsin C from beef spleen. J. Biol. Chem., 234 (2): 316-319, 1959.
- DETERMAN, H. & MICHEL, W. - The correlation between molecular weight and elution behavior in the gel chromatography of proteins. J. Chromatog., 25: 303-313, 1966.
- DEVILLEZ, E. J. - Isolation on the proteolytic digestive enzymes from the gastric juice of the crayfish *Orconectes virilis* (Hagen). Comp. Biochem. Physiol., 14: 577-586, 1965.
- DEVILLEZ, E.J. - Observations on the proteolytic enzymes in the digestive fluid of the barnacle *Balanus nubilus*. Comp. Biochem. Physiol., 51 A: 471-474, 1975.
- DEVILLEZ, E. & BUSCHLEN, H. - Survey of a tryptic digestive enzyme in various species of crustacea. Comp. Biochem. Physiol., 21: 541-546, 1967.
- DEVILLEZ, E.J. & LAU, J. - Specificity and digestive function of an alkaline proteinase of crayfish gastric juice. Fed. Proc. (abstr.), 28: 788, 1969.
- DEVILLEZ, E.J. & LAU, J. - Specificity and digestive function of alkaline proteinase from the gastric juice of the crayfish *Orconectes virilis*. Int. F. Biochem., I 1: 108-114, 1970.

- DRUCKER, H. - Sensitive radiochemical assay for proteolytic activities. Anal. Biochem., 46: 598-603, 1972.
- EISEN, A.Z. & JEFFEREY, J.J. - An extractable collagenase from crustacean hepatopancreas. Biochem. Biophys. Acta, 191: 517-526, 1969.
- EITENMILLER, R.R. - Cathepsin activity of *Penaeus setiferus* muscle. J. Food Sci., 39: 6-9, 1974.
- ERICKSON, M.C.; GORDON, D.T. & ANGLEMIER, A.F. - Proteolytic activity in the sarcoplasmic fluids of parasitized Pacific whiting (*Merluccius productus*) and unparasitized true cod (*Gadus macrocephalus*). J. Food Sci., 48: 1315-1319, 1983.
- ESKIN, N.A.M.; HENDERSON, H.M. & TOWNSEND, R.J. - Biochemistry of Foods. Academic Press. London, 1971. p. 109-151.
- FOLCO, E.J.; BUSCONI, L.; MARTONE, C.; TRUCCO, R.E. & SÁNCHEZ, J. J. - Action of two alkaline proteases and trypsin inhibition from white croaker skeletal muscle (*Micropogon opercularis*) in the degradation of myofibrillar protein. Febs Letters, 176 (1): 215-219, 1984.
- FOLK, J.E. & SCHIRMER, E.W. - Chymotrypsin C. 1. Isolation of the zymogen and the active enzyme: preliminary structure and specificity studies. J. Biol. Chem., 240(1): 181-192, 1965.
- GALGANI, F.G.; BENYAMIN, Y. & CECCALDI, H.J. - Identification of digestive proteinases of *Penaeus kerathurus* (Forsk.) : a comparison with *Penaeus japonicus* Bate. Comp. Biochem. Physiol., 78 B (2): 355-361, 1984.
- GALGANI, F. & NAGAYAMA, F. - Characteristic of digestive proteolysis of the crabs *Portunus trituberculatus*, *Portunus sanguinolentus* and *Charybdis japonica*. Bull. Japan. Soc. Sci. Fish., 52 (12): 2183-2188, 1986.
- GATES, B.J. & TRAVIS, J. - Isolation and comparative properties of shrimp trypsin. Biochem., 8 (11): 4483-4489, 1969.

- GEL FILTRATION - Theory and Practice - PHARMACIA FINE CHEMICALS (Instruções do Fabricante).
- GOA, J. - A micro biuret method for protein determination. Determination of total protein in cerebrospinal fluid. Scand. J. Clin. Lab. Invest., 5: 218-222, 1953.
- GONZALEZ, E.P. - Estudio bioquímico de la lagosta *Panuliris argus*. I. Notas sobre investigaciones nº 3. Centro de Investigaciones Pesqueiras. Departamento de Pesca del Instituto Nacional de Reforma Agrária, 63 pp., 1961. Cuba.
- GRANT, G.A.; SACCHETTINI, J.C. & WELGUS, H.G. - A collagenolytic serine protease with trypsin-like specificity from the fiddler crab *Uca pugilator*. Biochem., 22: 354-358, 1983.
- GREENBAUM, L.M. & FRUTON, J.S. - Purification and properties of beef spleen cathepsin B. J. Biol. Chem., 226: 173-180, 1957.
- GRONINGER JR., H.S. - Partial purification and some properties of a proteinase from Albacore (*Germon alalunga*) muscle. Arch. Biochem. Biophys., 108: 175-182, 1964.
- HARA, K.; ARANO, H. & ISHIHARA, T. - Purification of alkaline protease of rotifer *Brachionus plicatilis*. Bull. Japan. Soc. Sci. Fish., 50 (9): 1605-1609, 1984.
- HARA, K.; ARANO, H. & ISHIHARA, T. - Some enzymatic properties of alkaline proteases of the rotifer *Brachionus plicatilis*. Bull. Japan. Soc. Sci. Fish., 50(9): 1611-1616, 1984 a.
- HEAD, E.J.H. & CONOVER, R.J. - Induction of digestive enzymes in *Calanus hyperboreus*. Mar. Biol. Letters, 4: 219-231, 1983.
- HOFER, R. - The adaptation of digestive enzymes to temperature, season and diet in roach, *Rutilus rutilus* and rudd *Scardinius erythrophthalmus*; Proteases. J. Fish. Biol., 15: 373-379, 1979.

- HOLZMAN, T.F.; WILLIAMS, D.C. & RUSSO, S.F. - Evidence for the presence of a trypsinogen-like zymogen in the tissues of the sea star *Pisaster ochraceus*. Physiol. Chem. Phys., 14: 565-580, 1982.
- HUANG, F.L. & TAPPEL, A.L. - Action of cathepsins C and D in protein hydrolysis. Biochem. Biophys. Acta, 236: 739-748, 1971.
- HUGGINS, A.K. & MUNDAY, K.A. - Crustacean metabolism. Adv. Comp. Physiol. Biochem., 3: 271-378, 1968.
- INFORMATIVO BRASCEN NORDESTE - Papaína. Ano I, Número 5. 1979. Recife.
- JÓNÁS, E.; RAGYANSZKI, M.; OLÁH, J. & BOROSS, L. - Proteolytic digestive enzymes of carnivorous (*Silurus glanis* L.), herbivorous (*Hypophthalmichthys molitrix* Val.) and omnivorous (*Cyprinus carpio* L.) fishes. Aquaculture, 30: 145-154, 1983.
- KELLER, P.J.; COHEN, E. & NEURATH, H. - Purification and properties of procarboxypeptidase. J. Biol. Chem., 223: 457-467, 1956.
- KELVIN, L. - Enzyme kinetics. In: Introduction to the Biochemistry of Foods. Braverman, J.B.S. (ed.) pp. 177-186. Elsevier Publishing Company. Amsterdam. London. New York., 1963.
- KOSZALKA, T.R. & MILLER, L.L. - Proteolytic activity of rat skeletal muscle. II. Purification and properties of an enzyme active optimally at pH 8,5 to 9,0. J. Biol. Chem., 235 (3): 669-672, 1960.
- KOZLOVSKAYA, E.P. & VASKOVSKY, V.E. - A comparative study of proteinases of marine invertebrates. Comp. Biochem. Physiol., 34: 137-142, 1970.

- LEBLANC, E.L. & GILL, T.A. - Comparative study of proteolysis in short - finned (*Illex illecebrosus*) and long - finned (*Loligo pealei* Leseur) squid. Comp. Biochem. Physiol., 73 B (2): 201-210, 1982.
- LEE, P.G.; BLAKE, N. J. & RODRICK, G. E. - A quantitative analysis of digestive enzymes for the freshwater prawn *Macrobrachium rosenbergii*. Proc. World Maricult. Soc., 11: 392-402, 1980.
- LEHNINGER, A.L. - Princípios de Bioquímica. Sarvier. XXIV + 725 pp. ilustr., 1985. São Paulo.
- LIN, T.; SU, H.K. & LANIER, T.C. - Characterization of fish muscle protease using radio - labeled protein substrates. J. Food Sci., 45: 1036-1039, 1980.
- LOWRY, O.H.; ROSEBROUGH, N.J.; FARR, A.L. & RANDALL, R.J. - Protein measurements with the folin phenol reagent. J. Biol. Chem., 193: 265-275, 1951.
- MAKINODAN, Y. & IKEDA, S. - Studies on fish muscle protease - I. On the existence of two kinds of proteinase active in acid and in slightly alkaline pH range. Bull. Japan. Soc. Sci. Fish., 35 (7): 672-676, 1969.
- MAKINODAN, Y. & IKEDA, S. - Studies on fish muscle protease - II. Purification and properties of a proteinase active in slightly alkaline pH range. Bull. Japan. Soc. Sci. Fish., 35 (8): 749-757, 1969 a.
- MAKINODAN, Y. & IKEDA, S. - Studies on fish muscle protease - III. Purification and properties of a proteinase active in acid pH range. Bull. Japan. Soc. Sci. Fish., 35 (8): 758-766, 1969 b.
- MARTINS, C.B. & WHITAKER, J.R. - Catheptic enzymes and meat tenderization. 1. Purification of cathepsin D and its action on actomyosin. J. Food Sci., 33 (1): 59-64, 1968.

- MAUGLE, P.D.; DESHIMARU, O.; KATAYAMA, T. & SIMPSON, K.L. - Characteristics of amylase and protease of the shrimp *Penaeus japonicus*. Bull. Japan. Soc. Sci. Fish., 48(12): 1753-1757, 1982.
- MAUGLE, P.D.; DESHIMARU, O.; KATAYAMA, T. & SIMPSON, K.L. - Effect of short-necked clam diets on shrimp growth and digestive enzyme activities. Bull. Japan. Soc. Sci. Fish., 48 (2): 1759-1764, 1982 a.
- MAYZAUD, P. & MAYZAUD, O. - Kinetic properties of digestive carbohydrases and proteases of zooplankton. Can. J. Fish. Aquat. Sci., 38: 535-543, 1981.
- MIYADA, D.S. & TAPPEL, A.L. - The hydrolysis of beef proteins by various proteolytic enzymes. Food Res., 21: 217-225, 1956.
- MORISHITA, T. - Studies on the protein digestive enzymes of octopus *Octopus vulgaris* Cuvier. Bull. Fac. Fish. Mie Univ., 5: 155-282, 1978.
- MURAKAMI, K. & NODA, M. - Studies on proteinases from the digestive organs of sardine. I. Purification and characterization of three alkaline proteinases from the pyloric caeca. Biochem. Biophys. Acta, 658: 17-26, 1981.
- MURAMATSU, T. & KAKIUCHI, H. - Proteolytic activity of extracts from the hepatopancreas of shrimp, *Parahaliporus sibogae* (De Man). Bull. Japan. Soc. Sci. Fish., 44 (2): 171-174, 1978.
- MURAMATSU, T. & MORITA, T. - Anionic trypsin-like enzymes from the crab *Eriocheir japonicus* De Haan active in more acidic media. Comp. Biochem. Physiol., 70 B: 527-533, 1981.
- MYCEK, M.J. - Cathepsins. In: Methods in Enzymology. Perlmann G.E. & Lorand L. Vol. XIX, pp. 285-315. Academic Press, New York and London, 1970.

- NODA, M. & MURAKAMI, K. - Studies on proteinases from the digestive organs of sardine. - II. Purification and characterization of two acid proteinases from the stomach. Biochem. Biophys. Acta, 658: 27-34, 1981.
- NODA, M.; VO VAN, T.; KUSAKABE, I. & MURAKAMI, K. - Substrate specificity and salt inhibition of five proteinases isolated from the pyloric caeca and stomach of sardine. Agric. Biol. Chem., 46 (6): 1565-1569, 1982.
- OGAWA, M. & PAULA, A.M. - Aproveitamento do cefalotórax de lagostas, em forma de carne ou patê. Arq. Ciên. Mar., 11 (2): 161-163, 1971.
- OLALLA, A.; OSUNA, C.; SEBASTIAN, J.; SILLERO, A. & GÜNTHER SILLERO, M. A. - Purification and properties of three proteases from the larvae of the brine shrimp *Artemia salina*. Biochem. Biophys. Acta, 523: 181-190, 1978.
- PARRISH JR., F.C. & BAILEY, M.E. - Physiochemical properties and partial purification of porcine muscle cathepsin. J. Agr. Food. Chem., 14: 232-237, 1966.
- PARRISH JR., F.C. & BAILEY, M.E. - Physiochemical properties of bovine muscle particulate cathepsin. J. Agr. Food. Chem. 15: 88-94, 1967.
- PASSANO, L.M. - Molting and its control. In: The Physiology of Crustacea. T.H. Waterman ed. Vol. I. Metabolism and Growth. Academic Press. XVII + 670 pp., ilust., 1960. London.
- PFLEIDERER, G.; ZWILLING, R. & SONNEBORN, H.H. - Eine protease vom molekulargewicht 11,000 und eine trypsinähnliche fraktion aus *Astacus fluviatilis* Fabr. Z. Phys. Chem., 348: 1319-1331, 1967.
- PRAHL, J.W. & NEURATH, H. - Pancreatic enzymes of the spiny Pacific dogfish. I. Cationic chymotrypsinogen and chymotrypsin. Biochem., 5 (6): 2131-2146, 1966.

- PRISCO, J.T. & VIEIRA, G.H.F. - Effects of NaCl salinity on nitrogenous compounds and proteases during germination of *Vigna sinensis* seeds. Physiol. Plant., 36: 317-320, 1976.
- REECK, G.R. & NEURATH, H. - Pancreatic trypsinogen from the African lungfish. Biochem., 11 (4): 503-510, 1972.
- REVISTA BRASILEIRA DE TECNOLOGIA. IPT, décadas de pesquisas. vol. 19, nº 2. Fev./88, pp. 6-13. São Paulo.
- RIBAS, I.M.A. - Contribuição ao estudo das enzimas proteolíticas da corvina (*Micropogon furnieri*). Campinas, 1978. (Tese de Mestrado. Faculdade de Alimentos e Agrícola. Universidade Estadual de Campinas).
- RICK, W. - Chymotrypsin. In: Methods of Enzymatic Analysis. Bergmeyer, Hans Ulrich., p. 800-806, 1965.
- RICK, W. - Trypsin. In: Methods of Enzymatic Analysis. Bergmeyer, Hans Ulrich., p. 807-818, 1965 a.
- RICK, W. - Pepsin, pepsinogen, uropepsinogen. In: Methods of Enzymatic Analysis. Bergmeyer, Hans Ulrich., p. 819-823, 1965 b.
- SAKAI, J. & MATSUMOTO, J.J. - Proteolytic enzymes of squid mantle muscle. Comp. Biochem. Physiol., 68 B: 389-395. 1981.
- SAKER, S.A.; VIEIRA, G.H.F. & SAMPAIO, A.H. - Ensaio preliminar ao estudo de caracterização e propriedades de enzimas proteolíticas em hepatopâncreas de jovens da lagosta *Panulirus laevicauda* (Latreille). Arq. Cien. Mar., 22(1/2): 57-66, 1982.
- SALEM, H.; YOUSSEF, A.M.; EL-NAKKADI, A.M.N. & BEKHEIT, M. - Proteolytic decomposition of shellfish muscle protein under different conditions. Alex. J. Agr. Res., 18: 61-66, 1970.

- SAMAIN, J.F.; DANIEL, J.Y. & LE COZ, J.R. - Trypsine, amylase et protéines du zooplancton: dosage automatique et manuel. J. Exp. Mar. Biol. Ecol., 29: 279-289, 1977.
- SATHER, B.T. - A comparative study of amylases and proteinases in some decapod crustacea. Comp. Biochem. Physiol., 28: 371-379, 1969.
- SHINODA, O. - Über die eiweisslosenden enzyme in magensalft von *Astacus*. Z. Vergleich. Physiol., 7: 323-364, 1928.
- SIEBERT, G. - Aktivität eiweiss spaltender enzyme in fischen. Experientia, XIV (2): 65-66, 1958.
- SIMPSON, B.K. & HAARD, N.F. - Purification and characterization of trypsin from the Greenland cod (*Gadus ogac*). 1. Kinetic and thermodynamic characteristics. Can. J. Biochem. Cell. Biol., 62: 894-900, 1984.
- SIMPSON, B.K. & HAARD, N.F. - Trypsin from Greenland cod as a food-processing aid. J. Appl. Biochem., 6: 135-143, 1984 a.
- SIQUEIRA, G.N.V.D. - Caracterização preliminar de proteases em fígado de cangulo *Balistes venula* Linnaeus. Fortaleza, 1986. (Tese de Graduação. Departamento de Engenharia de Pesca. Universidade Federal do Ceará.
- STOREY, R.D. WAGNER, F.W. - Plant proteases: a need for uniformity. Review article number 21. Phytochem., 25(12): 2701-2709, 1986.
- SUNDARAM, S. & SARMA, P.S. - Purification and properties of a protease from the gut of *Etroplus suratensis*. Biochem., 77: 465-471, 1960.
- TAKAHASHI, T.; MORISHITA, T. & TACHINO, S. - Studies on the digestive enzymes of spiny lobster, *Panulirus japonicus* (V. SIEBOLD). Report of Faculty of Fisheries, Prefectural University of Mie, 5 (1): 127-135, 1964.

- TAKAHASHI, T.; MORISHITA, T. & TACHINO, S. - On the proteolytic enzyme of liver in marine animal. Report of Faculty of Fisheries, Prefectural University of Mie, 5(1): 137-144, 1964 a.
- TAKAHASHI, T.; MORISHITA, T. & TOMITA, K. - Solubilization of fish red muscle with proteolytic enzymes. Bull. Fac. Fish. Mie Univ., 11: 207-217, 1984.
- TALLAN, H.H.; JONES, M.E. & FRUTON, J.S. - On the proteolytic enzymes of animal tissues. X. Beef spleen cathepsin C. J. Biol. Chem., 194 (2): 793-805, 1952.
- TELFORD, M. - Comparative carbohydrase activities of some crustacean tissue and whole animal homogenates. Comp. Biochem. Physiol., 34: 81-90, 1970.
- TENUTA FILHO, A. & ZUCAS, S.M. - Cefalotórax de camarão-rosa. VI. Caracterização químico-nutricional do resíduo obtido após a recuperação da proteína. B. SBCTA, Campinas, 21 (3/4): 163-169, 1987.
- TING, C. Y.; MONTGOMERY, M.W. & ANGLEMIER, A.F. - Partial purification of salmon muscle cathepsins. J. Food Sci., 33: 617-621, 1968.
- TITANI, K.; SASAGAWA, T.; WOODBURY, R. G.; ERICSSON, L.H.; DÖRSAM, H.; KRAEMER, M.; NEURATH, H. & ZWILLING, R. - Amino acid sequence of crayfish (*Astacus fluviatilis*) trypsin. Biochem., 22: 1429-1465, 1983.
- TOCASAWA, Y.; KATSUMATA, T. & ISHIKAWA, M. - Studies on the proteinase of pyloric caeca - III. Preparation of crystalline proteinase of bonito pyloric caeca. Bull. Japan. Soc. Sci. Fish., 25 (6): 470-472, 1959.
- TOMÁŠEK, V.; SORM, F.; ZWILLING, R. & PFLEIDERER, G. - Serine-containing active center of the trypsin-like protease of crayfish *Astacus leptodactylus*: Febs Letters, 6 (3): 229-231, 1970.

- TRAVIS, D.F. - The molting cycle of spiny lobster, *Panulirus argus* Latreille. II. Pre-ecdysial histological and histochemical changes in the hepatopancreas and integumental tissues. Biol. Bull., 108: 88-112, 1955.
- TRELLU, J. & CECCALDI, H. J. - Variations des activités enzymatiques de l'hépatopancreas et du muscle de *Palaemon serratus* Pennant (Crustacé Décapode) au cours du cycle d'intermue. Société de Biologie de Marseille: 115-120, 1976.
- VAN WEEL, P.B. - "Hepatopancreas?". Review article. Comp. Biochem. Physiol., 47 A: 1-9, 1974.
- VIEIRA, G.H.F.; SILVA, L.C.; SAKER-SAMPAIO, S. & SAMPATO, A.H. - Ensaio preliminar ao estudo das proteases em hemolinfa de jovens da lagosta *Panulirus laeviscauda* (Latreille). Arq. Ciên. Mar, 24: 73-79, 1985.
- VO, V. T.; KUSAKABE, I. & MURAKAMI, K. - Purification and some properties of two aminopeptidases from sardines. Agric. Biol. Chem., 47 (11): 2453-2459, 1983.
- VONK, H.J. - Digestion and metabolism. In: The Physiology of Crustacea. Waterman T.H.. Vol. 1, p. 291-316. Academic Press. XVII + 670 pp, 1960. London.
- WINDSOR, M. & BARLOW, S. - Introduction to Fishery by Products. Fishing News Book Ltd. 187 pp., 1981. England.
- WOJTOWICZ, M.B. & ODENSE, P.H. - The effect of urea upon the activity measurement of cod muscle cathepsin with hemoglobin substrate. Can. J. Biochem., 48: 1050-1053, 1970.
- WOJTOWICZ, M.B. & ODENSE, P. H. - Comparative study of the muscle catheptic activity of some marine species. J. Fish. Res. Bd. Canada, 29: 85-90, 1972.

- YOSHINAKA, R.; SATO, M.; TANAKA, H. & IKEDA, S. - Purification and characterization of a new metalloproteinase with elastolytic activity from catfish pancreas. Biochem. Biophys. Acta, 798: 240-246, 1984.
- YOSHINAKA, R.; SUZUKI, T.; SATO, M. & IKEDA, S. - Purification and some properties of anionic trypsin from catfish pancreas. Bull. Japan. Soc. Sci. Fish., 49(2): 207-212, 1983.
- ZWILLING, R.; DÖRSAM, H.; TORFF, H. & RÖDL, J. - Low molecular mass protease: evidence for a new family of proteolytic enzymes. Febs Letters, 127 (1): 75-78, 1981.
- ZWILLING, R.; JAKOB, F.; BAUER, H.; NEURATH, H. & ENFIELD, D.L. - Crayfish carboxypeptidase. Affinity chromatography, characterization and amino-terminal sequence. Eur. J. Biochem., 94: 223-229, 1979.
- ZWILLING, R.; NEURATH, H.; ERICSSON, L.H. & ENFIELD, D.L. - The amino-terminal sequence of an invertebrate trypsin (crayfish *Astacus leptodactylus*): homology with other serine proteases. Febs Letters, 60 (2): 247-249, 1975.
- ZWILLING, R.; PFLEIDERER, G.; SONNEBORN, H.H.; KRAFT, V. & STUCKY, I. - The evolution of endopeptidases - V. Common and different traits of bovine and crayfish trypsin. Comp. Biochem. Physiol., 28: 1275-1287, 1969.