

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

CARACTERIZAÇÃO PRELIMINAR DE PROTEASES EM
FÍGADO DE CANGULO Balistes vetula Linnaeus.

Grace N.V. Diogo de Siqueira

Dissertação apresentada ao Departamento de Engenharia de Pesca do Centro de Ciências Agrárias da Universidade Federal do Ceará, como parte das exigências para obtenção do título de Engenheira de Pesca.

FORTALEZA-CEARÁ

Dezembro-1986

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal do Ceará
Biblioteca Universitária

Gerada automaticamente pelo módulo Catalog, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

S63c Siqueira, Grace N.V. Diogo de.
Caracterização preliminar de proteases em fígado de Cangulo *Balistes vetula* Linnaeus /
Grace N.V. Diogo de Siqueira. – 1986.
50 f. : il.

Trabalho de Conclusão de Curso (graduação) – Universidade Federal do Ceará, Centro
de Ciências Agrárias, Curso de Engenharia de Pesca, Fortaleza, 1986.

Orientação: Prof. Gustavo Hitzschky Fernandes Vieira.

1. Peixe - Criação. 2. Cangulo (Peixe) - Criação. I. Título.

CDD 639.2

Prof. Adjunto GUSTAVO HITZSCHKY FERNANDES VIEIRA
- Professor Orientador -

COMISSÃO EXAMINADORA:

Prof. Adjunto JOSÉ RAIMUNDO BASTOS
- Presidente -

Engº de Pesca ALEXANDRE HOLANDA SAMPAIO

VISTO:

Prof. Adjunto PEDRO DE ALCÂNTARA FILHO
Chefe do Departamento de Engenharia de Pesca

Prof. Adjunto MOISÉS ALMEIDA DE OLIVEIRA
Coordenador do Curso de Engenharia de Pesca

LISTA DE FIGURAS

	<u>Página</u>
FIGURA 1 - Curva padrão de albumina sérica bovina (Sigma).....	10
FIGURA 2 - Curva padrão de l-tirosina(Merck).....	12
FIGURA 3 - Variação da atividade proteolítica específica de fígado de cangulo em função do pH, antes do processo de purificação.....	17
FIGURA 4 - Atividade proteolítica específica da enzima de fígado de cangulo em relação a sua saturação com sulfato de amônia.....	19
FIGURA 5 - Variação da atividade proteolítica específica de fígado de cangulo tratado com 60% de $(NH_4)_2SO_4$ em função do pH.....	21
FIGURA 6 - Variação da atividade proteolítica específica do fígado de cangulo em função da concentração de substrato.....	23
FIGURA 7 - Variação da atividade proteolítica específica de fígado de cangulo em relação ao tempo e temperatura de incubação.....	26
FIGURA 8 - Variação percentual da atividade proteolítica específica de fígado de cangulo em função do tempo e temperatura de aquecimento do extrato.....	28

LISTA DE TABELAS

Pág.

TABELA I - Dados relativos a variação da atividade proteolítica em fígado de cangulo <u>Balistes vetula</u> Linnaeus em função do pH de reação, antes do processo de purificação.....	16
TABELA II - Dados relativos a purificação com sulfato de amônia do sistema enzimático presente em fígado de cangulo <u>Balistes vetula</u> Linnaeus.....	18
TABELA III - Dados relativos a variação da atividade proteolítica em fígado de cangulo <u>Balistes vetula</u> Linnaeus, em função do pH de reação, após o tratamento com 60% de sulfato de amônia.....	20
TABELA IV - Dados relativos a variação da atividade proteolítica de fígado de cangulo <u>Balistes vetula</u> Linnaeus em função da concentração do substrato.....	22
TABELA V - Dados relativos a variação da atividade proteolítica específica de fígado de cangulo <u>Balistes vetula</u> Linnaeus em função do tempo e temperatura de incubação.....	25

TABELA VI - Variação percentual de atividade proteolítica específica no fígado de cangulo Balistes vetula Linnaeus em função do tempo e temperatura de aquecimento do extrato..... 27

TABELA VII - Ação de compostos químicos sobre a atividade proteolítica específica em fígado de cangulo Balistes vetula, considerando 100% a atividade da enzima sem a adição destes compostos..... 29

CARACTERIZAÇÃO PRELIMINAR DE PROTEASES EM FÍGADO DE CANGULO Balistes vetula Linnaeus.

Grace N.V. Diogo de Siqueira

I. INTRODUÇÃO

O cangulo, Balistes vetula Linnaeus é uma espécie demersal, encontrado em fundos coralinos e rochosos, sendo uma das espécies de grande representatividade na captura artesanal e consumido principalmente por populações de baixo poder aquisitivo.

Segundo Menezes (1981), o cangulo participa com grande relevância na produção da pesca artesanal, sendo sua abundância elevada, embora o volume atual de captura se apresente aquém do seu potencial produtivo. Apesar da população ainda se encontrar subexplorada, existem amplas possibilidades de que sua exploração venha a se desenvolver em bases industriais.

A produção de cangulo para o ano de 1983, de acordo com os dados da SUDEPE (1983), na região nordeste do Brasil foi da ordem de 701.593 Kg, e no ano de 1985, somente o estado do Ceará obteve 390.000kg.

O cangulo aparece comumente como subproduto da pesca do pargo e lagosta, ocorrendo com grande incidência nos manzuás e nas linhas pargueiras no momento de suas despescas. Em ambos os casos, os indivíduos são geralmente lançados ao mar, considerando que não há espaço suficiente para o acondicionamento dos mesmos e também porque o baixo valor comercial da espécie, não justifica o seu transporte para os portos de desembarque.

Essa produção ocasional não é computada nos dados oficiais da SUDEPE, uma vez que este órgão só registra a produção artesanal realizada pelos barcos que fazem as pescarias de ida e vinda.

O aproveitamento do pescado no nordeste brasileiro restringe-se somente ao tecido muscular, utilizado para o consumo humano.

Entretanto, sabe-se através da literatura que o pescado é uma fonte promissora de vários produtos de ação biológica, entre os quais destacam-se as enzimas proteolíticas.

Um vasto grupo de enzimas, algumas vezes chamado de proteases ou enzimas proteolíticas hidrolisam a molécula de proteína na ligação peptídica, resultando em estruturas mais simples. Entre os exemplos clássicos, são citados a pepsina, tripsina e quimiotripsina.

A pepsina é a mais estudada de todas as endopeptidases. Esta é segregada pela mucosa gástrica na forma de pepsinogênio inativo, o qual é convertido a pepsina sob a influência de íons hidrogênio, como também por ação autocatalítica da pepsina. O pepsinogênio apresenta um ponto isoelétrico de pH 3,7, enquanto a pepsina é aniônica mesmo em pH 1,0. A pepsina tem o peso molecular mais baixo do que o pepsinogênio. A hidrólise das proteínas pela pepsina exibe um ótimo de pH em torno de 1,5 a 2,5. A pepsina também possui ação coagulante no leite, com pH ótimo em torno de 5,0 (Cantarrow & Schepartz, 1967).

A tripsina é uma enzima proteolítica, cujo precursor inativo tripsinogênio é formado nas células exócrinas do pâncreas e segregado no lúmen do intestino. O zimógeno é convertido em enzima ativa pela enteroquinase e também autocataliticamente pela ação da tripsina formada, estando o pH ótimo para a ativação entre 7,0 e 9,0. O tripsinogênio forma-se durante o seu

processo de ativação, podendo entretanto, haver uma inibição de sua síntese por íons de cálcio, os quais impedem a agregação das moléculas de tripsina, mecanismo pelo qual há formação do tripsinogênio. A presença de íons de cálcio, além de aumentar a estabilidade da tripsina também parece ser responsável pela elevada atividade da enzima, em sistemas onde os mesmos estão presentes (Rick, 1974).

Uma outra enzima proteolítica originária do pâncreas é a quimiotripsina. Seu precursor, o quimiotripsinogênio, é transformado em enzima ativa pela tripsina, provavelmente através de um processo que envolve a quebra de ligações peptídicas internas da molécula do zimógeno, com a liberação de peptídeos alcalinos. O pH ótimo para a ativação do quimiotripsinogênio é aproximadamente o mesmo daquele para o tripsinogênio (Cantarow & Schepartz, 1967).

Inúmeros foram os trabalhos realizados em produtos marinhos buscando um maior entendimento sobre as características dessas principais proteases. Sabe-se hoje, que as enzimas proteolíticas podem apresentar-se de diversas formas nos tecidos vivos dos animais. Siebert (1958) acreditando que não existisse outra protease com pH ótimo próximo a neutralidade em músculo de peixes marinhos, afirmou que os tecidos frescos desses animais mostram atividades de catepsinas muito maior que os tecidos correspondentes em mamíferos.

Sather (1969) estudando as enzimas digestivas do hepatopâncreas de crustáceos, afirmou que a atividade proteolítica dos omnívoros Metapograpus messor e Procambarus clarkii é maior que aquela demonstrada para os carnívoros Podophthalmus vigi, Panulirus japonicus e Portunus sanguinolentus.

Dentre as proteases existentes no trato digestivo dos organismos marinhos, a tripsina e a quimiotripsina são as mais comumente encontradas. A caracterização da tripsina purificada de pescado tem revelado um grande número de propriedades similares à tripsina dos mamíferos. Estas propriedades incluem o peso molecular e a inibição da atividade proteolítica por determinados reagentes químicos.

Cohen et al. (1981) encontraram que o peso molecular aproximado da tripsina e quimiotripsina da carpa (Cyprinus carpio) está em torno de 25.000 e que estas enzimas não são estáveis em pHs baixos, mas retêm suas atividades no pH neutro na presença de Ca^{++} . As características destas proteases revelam um alto grau de semelhança com as enzimas dos mamíferos.

Trabalhando com o "catfish", Parasilurus asotus, Yoshinaka et al. (1983) informaram que não foi encontrada a forma ativa da tripsina em extratos de pâncreas, sendo os zimógenos ativados autocataliticamente, ao nível máximo, quando este extrato foi incubado a pH 8,0 e a 4°C durante 4 dias na presença de íons de cálcio. O peso molecular da tripsina aniônica de "catfish" foi determinado em 26.000, e seu ponto isoelétrico 5,4. A composição de aminoácidos desta enzima foi similar a das tripsinas aniônicas de muitas outras espécies de vertebrados, incluindo peixes.

Dentre outras características encontradas para a tripsina, Gates & Travis (1969) isolaram esta enzima da glândula digestiva do camarão Penaeus setiferus e encontraram que a mesma possui um ponto isoelétrico ácido, nenhum requerimento de Ca^{++} para a sua estabilidade, resistência a autodigestão e inativação 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 ter indicação de que essa enzima tenha a forma de zimógeno.

Titani et al. (1983) estudaram a sequência de aminoácidos da tripsina do Astacus fluviatilis e demonstraram que esta tem 43,6% de semelhança com a tripsina bovina e 40% com aquela do Streptomyces griseus. Em contraste com a tripsina dos mamíferos, a tripsina deste crustáceo é uma proteína mais acídica, sendo resistente a autodigestão e irreversivelmente desnaturada em pH inferior a 3,0. Segundo Zwilling et al. (1975) algumas dessas características são mais semelhantes à tripsina bacteriana do que a tripsina bovina.

Devido a grande abundância dos recursos marinhos, vários são os trabalhos que procuram demonstrar quais os organismos que apresentam maior taxa de atividade proteolítica.

Kozlovskaya & Vaskovsky (1970) pesquisaram 50 espécies de invertebrados marinhos e mostraram que duas classes são particularmente apropriadas como matéria-prima para os referidos trabalhos: a Asteroidea e a Crustacea, considerando a disponibilidade dos recursos e a elevada atividade.

Takahashi et al. (1964b) estudaram dez espécies de animais marinhos, entre eles moluscos e crustáceos e concluíram que nos fígados dos cefalópodos (Ommastrephes sloani pacificus, Sepia esculenta e Octopus vulgaris) e do crustáceo decápodo (Panulirus japonicus) a atividade proteolítica era marcadamente mais elevada do que aquela observada nos fígados dos peixes em estudo.

A protease isolada do trato digestivo de caranguejo Astacus leptodactylus, apresenta a mesma especificidade da tripsina bovina e é inibida tanto por inibidores sintéticos como por aqueles presentes naturalmente (Tomášek et al. 1970), sendo esta identificada mais tarde como uma

protease serínica (Zwilling et al., 1975).

A ocorrência dessas enzimas tem sido repetidamente observada em crustáceos. Brockerhoff et al. (1970) estudando as enzimas digestivas de Homarus americanus, mostraram que a tripsina da lagosta apresenta uma característica altamente aniônica, um pH ótimo em torno de 8,0 e um peso molecular de aproximadamente 25.000.

Gates & Travis (1969) purificaram a tripsina e, posteriormente, Maugle et al. (1982a) isolaram carboxipeptidases A e B do hepatopâncreas de Penaeus japonicus. Devillez & Buschlen (1967) examinando as enzimas digestivas de crustáceos encontraram atividade triptica no suco gástrico do camarão Pandalus platycerous.

Estudos do intestino do Etroplus suratensis demonstraram que a protease encontrada difere da tripsina dos mamíferos por apresentar um pH ótimo ligeiramente mais elevado. Esta enzima praticamente não é afetada por uma variedade de compostos químicos e não requer íons metálicos para sua ativação. O inibidor da tripsina presente na soja, diminui sua atividade proteolítica (Sundaram & Sarma, 1960).

Para testar a estabilidade de proteases de ceco pilórico e estômago de sardinha, Noda et al. (1982) utilizaram NaCl, cuja concentração variou de 0 a 25%. Estes encontraram que a atividade proteolítica das proteases alcalinas I, II e III foi fortemente inibida a proporção que maior quantidade de NaCl era adicionada ao meio de reação. Contudo, a extensão da inibição das enzimas proteolíticas variou com o tipo de substrato utilizado. Assim, uma concentração de NaCl indicando 50% de inibição foi 6 a 7% quando o substrato usado era a caseína e 9 a 12% quando a hemoglobina foi usada. A atividade proteolítica das proteases ácidas I e II foi

também inibida na presença de 15 a 20% de NaCl.

Croston (1960) estudou a atividade proteolítica das endopeptidases em extratos de ceco pilórico de salmão (Oncorhynchus tshawytscha). Duas atividades foram encontradas com propriedades semelhantes a tripsina e quimiotripsina de mamíferos. Ambas as atividades foram estabilizadas por íons de cálcio e inativadas pelo inibidor de tripsina presente na soja, da mesma forma que para as enzimas de mamíferos. As enzimas de peixe foram inativadas em soluções acídicas nas quais aquelas dos mamíferos são estáveis.

Ressaltando ainda estudos realizados com organismos marinhos, Reeck & Neurath (1972), Haën & Gertler (1974) e Haën et al. (1977) observaram que a pirambóia, Protopterus aethiopicis, ocupa uma posição intermediária entre os invertebrados e os mamíferos, exaltando o interessante fato de que seu tripsinogênio também parece ser intermediário em algumas propriedades nas tripsinas dos invertebrados e nas tripsinas catiônicas dos mamíferos. Assim, a tripsina da pirambóia, embora sendo aniônica e estável em pH neutro na ausência de cálcio, como na maioria das tripsinas dos invertebrados, é também estável em pH 3,0 como na maioria das tripsinas dos mamíferos.

O tubarão Squalus acanthias, em oposição aos tecidos de mamíferos, parece possuir exclusivamente quimiotripsinogênio entre os componentes catiônicos, ao passo que o tripsinogênio aparece na fração aniônica, apresentando caráter mais acídico que alcalino (Prahl & Neurath, 1966).

Como se pode ver, há um grande interesse no estudo das proteases de organismos marinhos tendo em vista dois aspectos fundamentais: conhecer mais profundamente a fisiologia e a bioquímica da espécie, o

que facilita o entendimento mais racional de sua biologia e 2 - avaliar a viabilidade de uma extração rentável dessas enzimas, uma vez que têm uma enorme aplicação em vários ramos industriais, destacando-se as indústrias de alimentos e farmacêuticas.

O presente trabalho também se enquadra nestes dois aspectos, visto que o seu objetivo é fornecer subsídios sobre a extração e caracterização de proteases de fígado de cangulo Balistes vetula Linnaeus., ainda que em estágio ainda preliminar.

II. MATERIAL E MÉTODOS

No presente estudo, utilizamos fígado de cangulo, Balistes vetula Linnaeus, capturados na costa de Fortaleza, em pescarias de ida e vinda, adquiridos na praia do Mucuripe.

O fígado foi extraído da cavidade abdominal por meio de um corte transversal, macerado em graal e homogeneizado em potter à temperatura de 4°C.

A fim de evitar que a gordura existente no fígado interferisse nos resultados e visando melhor conservação, foi feito o pó acetônico. O fígado homogeneizado foi suspenso em acetona fria (-15°C) na proporção 1:5 (p/v) e deixado em agitação por 1 hora. Após este período, a mistura foi filtrada a vácuo com auxílio de um funil de Büchner, e o filtrado suspenso novamente em acetona, repetindo-se a operação mais duas vezes, e, finalmente, tratada com a mistura acetona: éter etílico, 1:1 e novamente filtrada a vácuo. Todas as operações foram realizadas em câmara fria a 4°C.

Do pó acetônico foi preparado um extrato mediante a homogeneização do pó com tampão fosfato 0,01M em NaCl 0,1M, pH 7,0, na proporção de 1:50 (p/v).

A concentração de proteína foi determinada pelo método do Microbiureto (Goa, 1953), usando-se como padrão a albumina sérica bovina (Sigma, Figura 1), sendo os resultados expressos em milígrama (mg) de proteína por grama (g) de pó acetônico.

A atividade proteolítica foi determinada como a capacidade de hidrolisar a caseína e a hemoglobina.

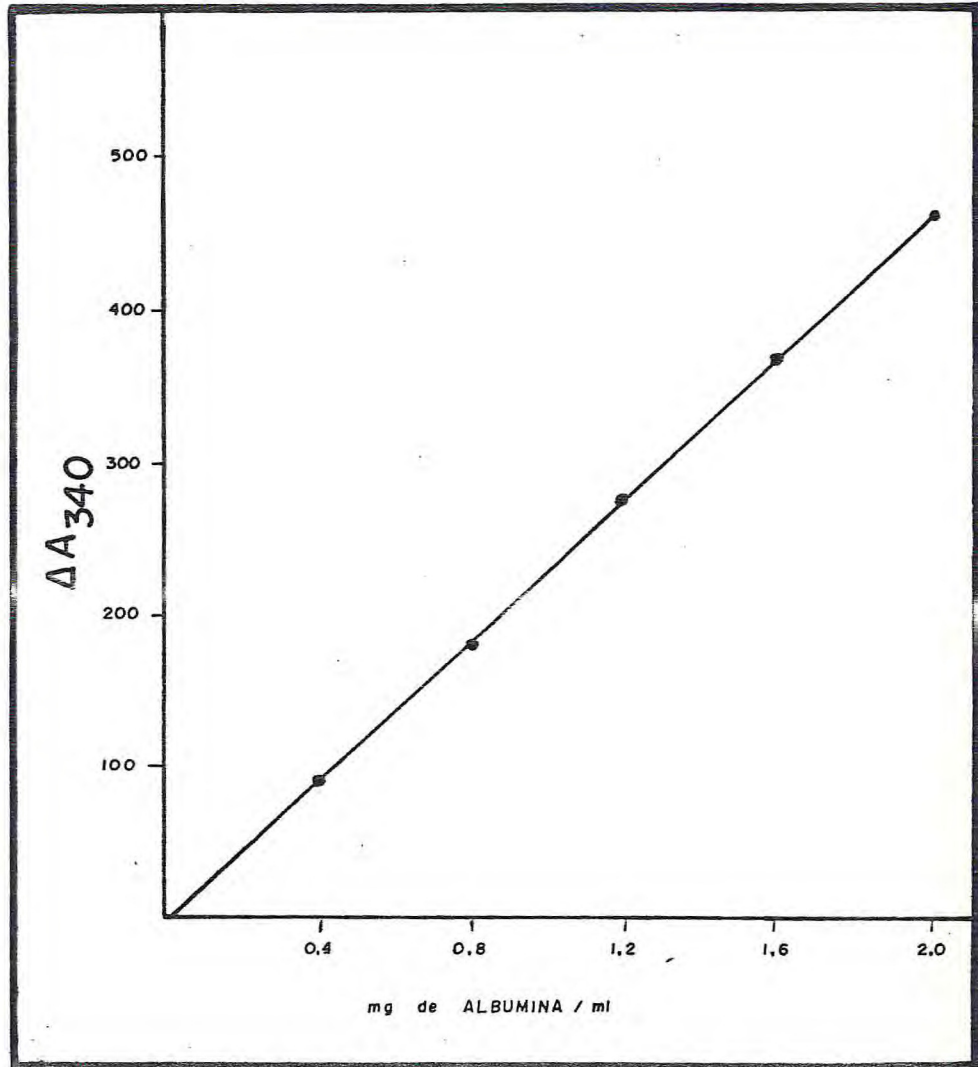


FIGURA 1 - Curva padrão de albumina sérica bovina (Sigma).

A reação enzimática desenvolveu-se pela adição de 0,5 ml do extrato do pó acetônico de fígado a 5,0ml de hemoglobina bovina (Sigma) a 1% em tampão citrato 0,1M e caseína (segundo Hammarsten, E. Merck Ag. Darmstadt) a 1% em tampão fosfato 0,1M e/ou tampão borato 0,5M (Dawson et al., 1969). A incubação ocorreu a 40°C durante 60 minutos. Parou-se a reação com 1,0ml de ácido tricloro-acético (TCA) a 40% (Ainouz et al., 1972). Após 30 minutos de repouso, a mistura foi filtrada em papel de filtro Whatman 42, sendo a atividade proteolítica determinada na fração solúvel em TCA e medida pela absorbância em 750nm em espectrofotômetro Bausch & Lomb Spectronic 20, depois da reação com o reagente de Folin (Lowry et al., 1951). O tempo zero ou branco da reação foi obtido pela adição do substrato após ter sido adicionado TCA a 40%. Todos os valores de densidade ótica das amostras foram subtraídos dos valores dos brancos. A atividade proteolítica foi expressa em micrograma (μg) de tirosina por grama (g) de pó acetônico, usando-se a tirosina (Merck) como padrão (figura 2), e a atividade específica determinada por meio da divisão da atividade proteolítica pela concentração de proteína sendo expressa em μg de tirosina por mg de proteína.

A determinação do pH ótimo da protease efetuou-se utilizando-se tampão citrato 0,1M nos pHs 2,6; 3,0; 3,6; 4,0; 4,6 e 5,0; tampão fosfato 0,1M nos pHs 6,0; 6,5; 7,0 e 7,5 e tampão borato nos pHs 8,0; 8,5; 9,0; 9,5 e 10,0. Os substratos (hemoglobina e caseína 1%) usados, também foram preparados nos respectivos pHs. A reação enzimática foi desenvolvida como descrita anteriormente e os resultados foram expressos em μg tirosina por grama de pó acetônico e μg tirosina por mg de proteína (atividade específica).

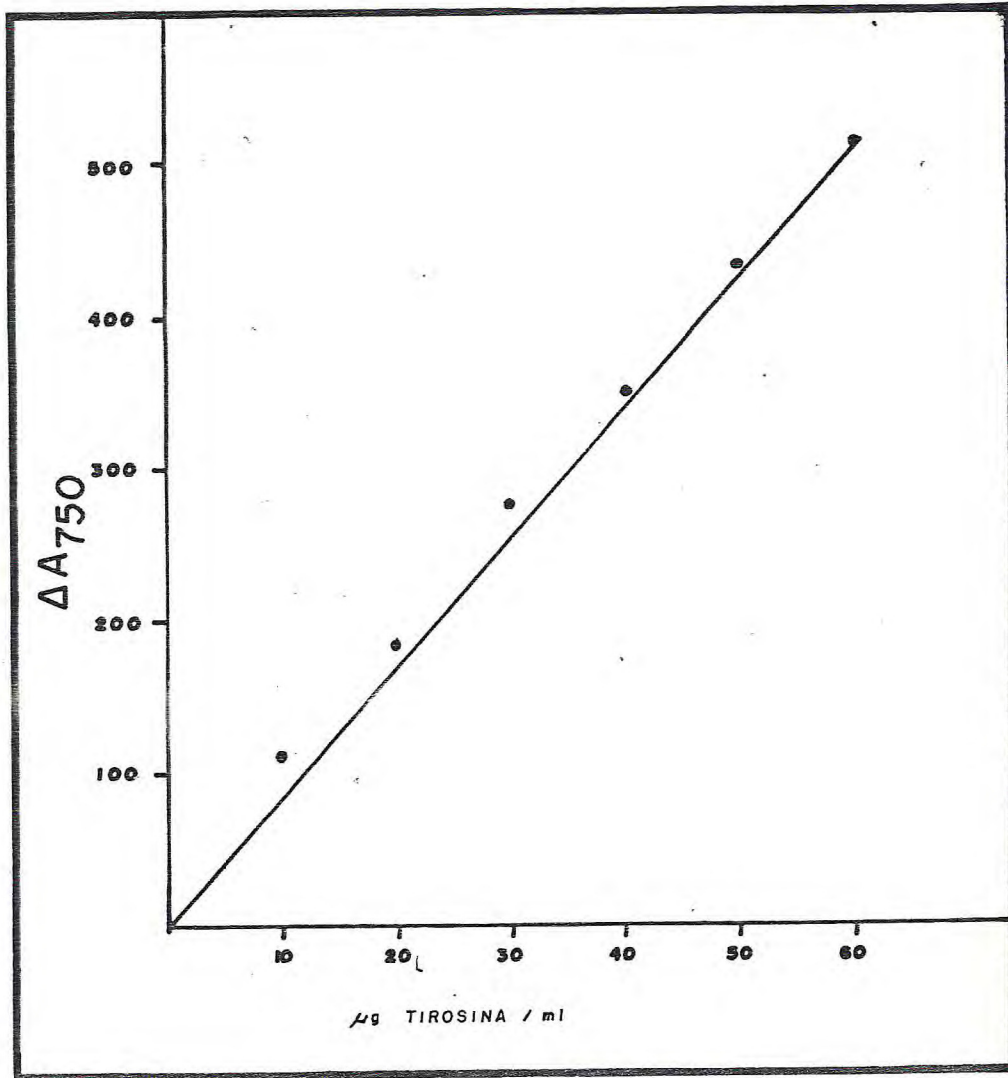


FIGURA 2 - Curva padrão de L-tirosina (Merck).

Os extratos de pó acetônico de fígado de cangulo, preparados com tampão fosfato 0,01M em cloreto de sódio (NaCl) 0,1M em pH 7,0 na proporção de 1:50 (p/v) foram usados para purificação com sulfato de amônia. O sulfato de amônia sólido foi gradualmente adicionado ao extrato para 20% de saturação e o precipitado foi removido por centrifugação em centrífuga International IEC (20.000 x g, 15 minutos, 4°C). O sobrenadante resultante foi usado para as próximas precipitações com 40, 60, 80 e 100% de saturação com $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$. Os precipitados obtidos foram suspensos em tampão fosfato 0,01M em cloreto de sódio (NaCl) 0,1M pH 7,0 e dialisados contra água destilada, durante um período de tempo necessário para que a água não apresentasse reação positiva com o hidróxido de bário.

Os extratos após a diálise foram liofilizados em liofilizador Mod. Pirani 78/1 da Edwards do Brasil, por 12 horas a -40°C , sob uma pressão inferior a 10^{-1} Torr.

O pó liofilizado foi suspenso em tampão fosfato 0,01M em cloreto de sódio (NaCl) 0,1M pH 7,0 e determinados a atividade proteolítica e a concentração de proteína nas 5 frações obtidas na purificação. Os resultados obtidos foram expressos em micrograma (μg) de tirosina por miligrama (mg) de proteína e miligrama (mg) de proteína por grama (g) de pó liofilizado para a atividade proteolítica específica e proteína, respectivamente.

Na fração de maior atividade foi realizada outra curva de pH, nos mesmos intervalos já citados.

Para a escolha da concentração de substrato a ser usada, foram feitos experimentos em que a concentração do substrato variou de 10 a 70 mg de caseína, conservando-se o volume de 0,5ml do extrato. A reação enzimática foi idêntica às anteriores e os resultados expressos em micrograma

(μ g) de tirosina por miligrama (mg) de proteína.

O tempo e a temperatura considerados ótimos foram determinados mediante a incubação em temperaturas de 40, 50, 55 e 60°C, durante períodos de 15, 30, 45 e 60 minutos. A reação enzimática foi semelhante aos demais ensaios e os resultados expressos em micrograma (μ g) de tirosina por miligrama (mg) de proteína.

A termo-estabilidade foi determinada submetendo-se o extrato a temperatura de 40, 50 e 60°C durante 15, 30, 45 e 60 minutos. Após cada tempo, o extrato era retirado da temperatura e, nele, determinada a atividade enzimática. Os resultados foram expressos em micrograma (μ g) de tirosina por miligrama (mg) de proteína, sendo transformados em porcentagens de atividade relativa ao extrato não submetido ao calor, cuja atividade foi considerada 100%.

O comportamento da enzima foi pesquisado frente aos seguintes reagentes na concentração de 1mM: cloreto de cálcio, cloreto de mercúrio, cloreto de sódio, cloreto de ferro III, EDTA, cloreto de manganês, tiosulfato de sódio, ácido ascórbico, ácido cítrico e 2-mercaptoetanol. A atividade da enzima sem a adição de qualquer reagente foi considerada 100%. A reação enzimática procedeu-se da mesma forma citada anteriormente.

III. RESULTADOS

Com o intuito de determinar as condições ótimas de ensaio, foi utilizado fígado de cangulo Balistes vetula Linnaeus como fonte de enzima.

A atividade proteolítica foi determinada em uma faixa de pH que variou de 2,6 a 10,0. Na faixa ácida, usando-se a hemoglobina 1% como substrato, foi verificado cerca de 28% da atividade observada na faixa alcalina que mostrou o pH 8,5 como o de máxima atividade, quando a caseína 1% foi utilizada como substrato (Tabela I, figura 3).

Imediatamente após o estabelecimento preliminar desse pH ótimo de reação, foi procedido o método de purificação do sistema enzimático pela adição gradual de sulfato de amônia, onde se observa que a fração entre 40-60% de saturação foi aquela que apresentou maior atividade proteolítica específica. Com este tratamento, o acréscimo de atividade em relação ao extrato bruto é de 12,93 vezes, correspondendo a 1.293% e havendo uma recuperação de 738,46% (Tabela II, figura 4).

Após o sistema enzimático apresentar-se parcialmente purificado, foi procedida outra curva de pH nos mesmos valores anteriormente citados. O pH ótimo de reação foi então estabelecido como sendo 9,0 (Tabela III, figura 5). Com este valor determinado, os ensaios posteriores foram realizados no referido valor de pH.

A relação enzima substrato (Tabela IV, figura 6), mostra que a saturação do complexo enzima-substrato é atingido quando 50mg de caseína reage com 0,5ml de extratos oriundos de uma solução preparada do pó liofilizado na concentração de 1:500 (p/v).

TABELA I - Dados relativos a variação da atividade proteolítica em fígado de cangulo Balistes vetula Linnaeus em função do pH de reação, antes do processo de purificação. Valor da proteína 173,36mg / g de pó.

pH	Atividade proteolítica (μ g Tir./g pó)	Atividade proteolítica espe- cífica (μ g Tirosina/mg pro- teína).
2,6	10.503	60,58
3,0	11.670	67,32
3,6	10.530	60,58
4,0	11.086,5	63,95
4,6	9.919,5	57,22
5,0	9.336	53,85
6,0	7,002	40,39
6,5	7.586	43,76
7,0	9.336	53,85
7,5	10.503	60,58
8,0	20.422,5	117,80
8,5	37.927,5	218,78
9,0	29.175	168,29
9,5	26.257,5	151,46
10,0	23.340	134,63

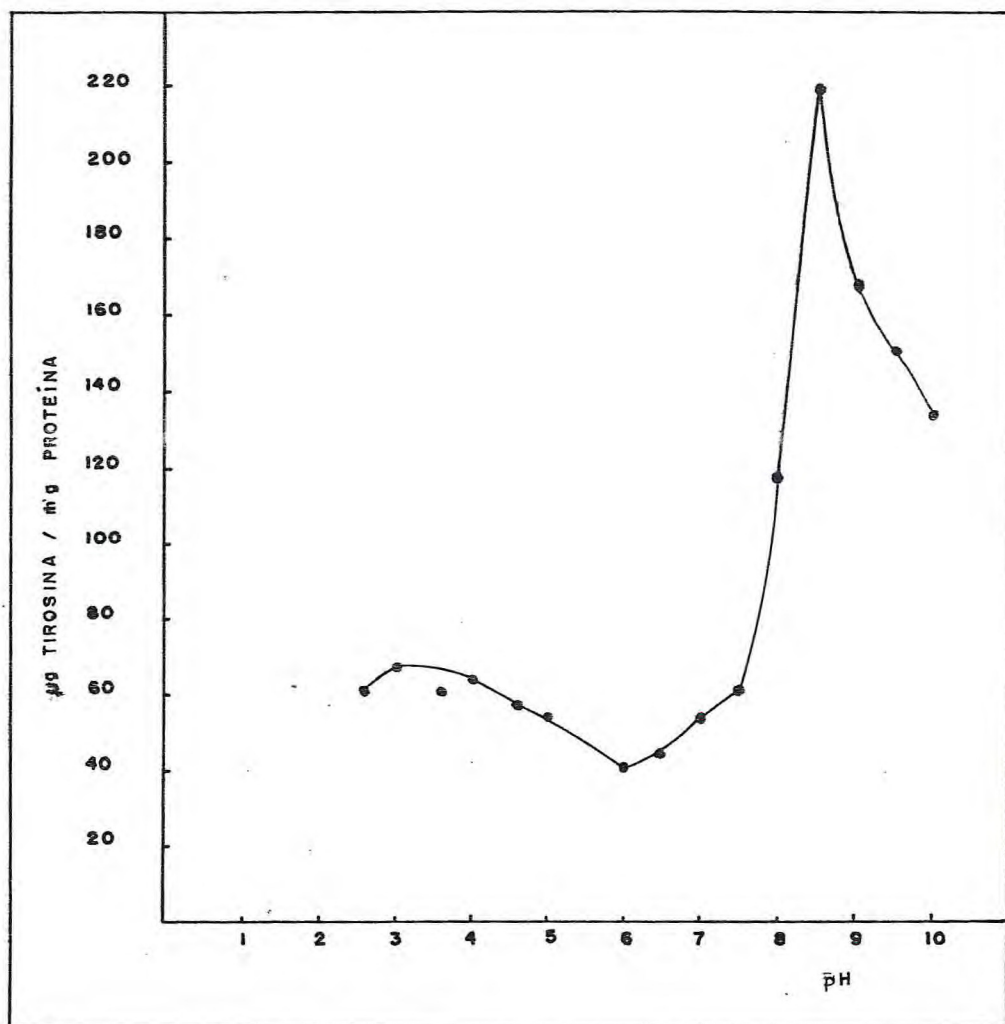


FIGURA 3 - Variação da atividade proteolítica específica de fígado de can_gulo em função do pH, antes do processo de purificação.

TABELA II - Dados relativos a purificação com sulfato de amônia do sistema enzimático presente em fígado de cangulo Balistes vetula Linnaeus. A reação procedeu-se no pH 8,5.

Fração	Atividade prot. (μg Tir./g pó)	At. Prot. específica (μg Tir./mg Prot.)	Proteína (mg Prot./ g pó)	Recuperação (%)	Veze de purificação
0	37.927,5	218,78	173,36	100,0	1,0
0 - 20	0	0	0	-	-
20 - 40	116.700	816,08	143,0	307,69	3,73
40 - 60	280.080	2.829,09	99,0	738,46	12,93
60 - 80	11.670	132,61	88,0	30,77	0,61
80 - 100	0	0	66,0	-	-

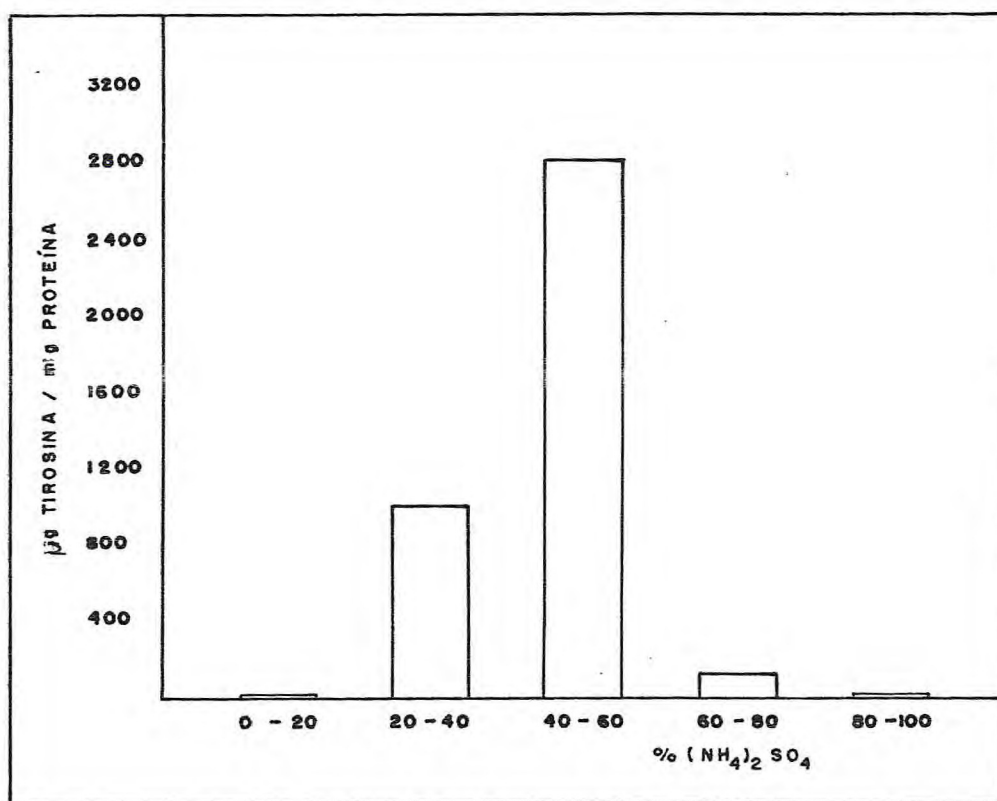


FIGURA 4 - Atividade proteolítica específica da enzima de fígado de cangulo em relação a sua saturação com sulfato de amônia.

TABELA III - Dados relativos a variação da atividade proteolítica em fígado de cangulo Balistes vetula Linnaeus, em função do pH de reação após o tratamento com 60% de sulfato de amônia. Valor da proteína 88,0 mg/g de pó.

pH	Atividade proteolítica (μ g Tir./g pó)	Atividade proteolítica específica (μ g Tir. /mg Prot.)
2,6	23.340,0	265,23
3,0	32.092,5	364,69
3,6	35.010,0	397,84
4,0	26.257,5	298,38
4,6	37.927,5	430,99
5,0	58.350,0	663,07
6,0	105.030,0	1.193,52
6,5	157.545,0	1.790,28
7,0	204.225,0	2.320,74
7,5	256.740,0	2.917,50
8,0	256.740,0	2.917,50
8,5	280.080,0	3.182,73
9,0	306.337,5	3.481,11
9,5	285.915,0	3.249,03
10,0	247.987,5	2.818,04

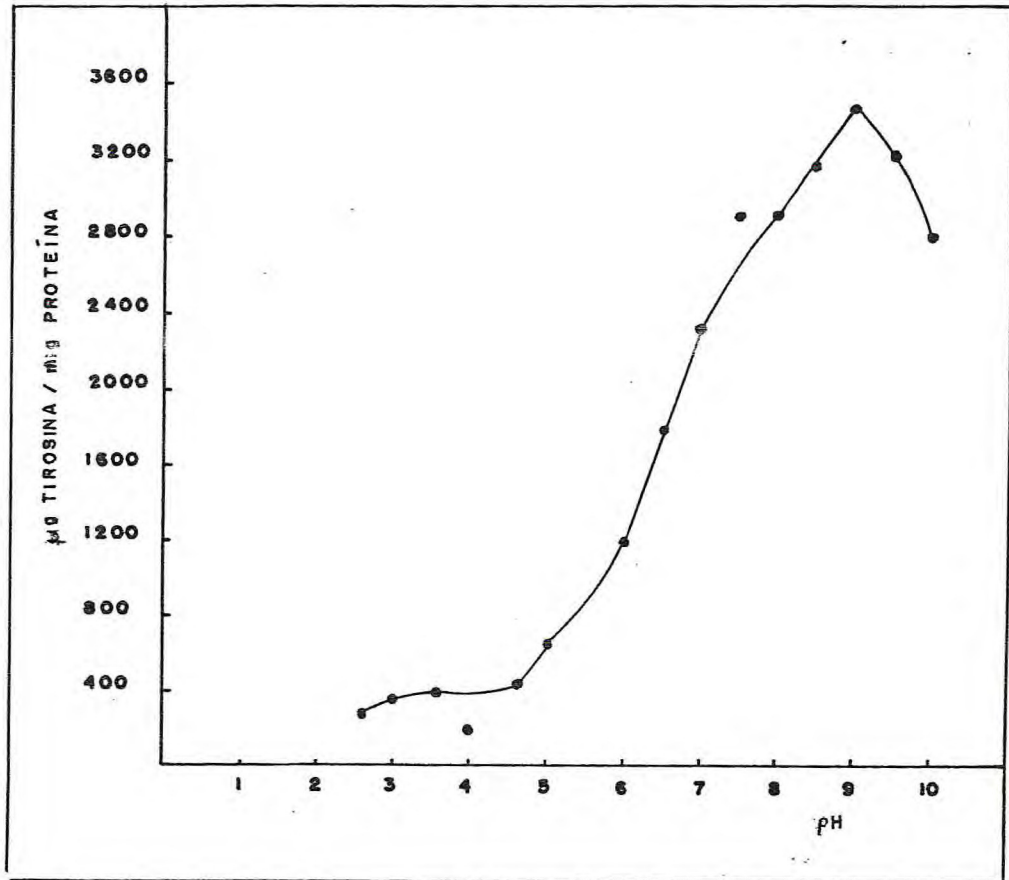


FIGURA 5 - Variação da atividade proteolítica específica de fígado de cangulo tratado com 60% de $(\text{NH}_4)_2 \text{SO}_4$ em função do pH.

TABELA IV- Dados relativos a variação da atividade proteolítica de fígado de cangulo Balistes vetula Linnaeus em função da concentração do substrato. Reação procedida em pH 9,0 e valor de proteína igual a 41,58 mg/g de pó.

Mg Caseína	Atividade proteolítica (µg Tir/g pó)	Atividade proteolítica específica (µg Tir/mg Prot).
10	198.390	4.771,3
20	280.080	6.735,9
30	285.915	6.876,3
40	288.832,5	6.946,4
50	303.420	7.297,3
60	282.997,5	6.806,1
70	288.832,5	6.946,4

A determinação do tempo e temperatura ótimos de reação está registrada na tabela V e figura 7. Inicialmente, pode se observar que a atividade proteolítica específica, medida a intervalos regulares de 15 minutos, é crescente com o aumento da temperatura. Embora esse comportamento seja similar para todas as temperaturas estudadas, após decorridos sessenta (60) minutos a 50°C o incremento em termos percentuais da atividade proteolítica específica é mais pronunciado, quando comparado aos demais. Por esta razão esses parâmetros foram escolhidos para os ensaios enzimáticos.

A estabilidade da enzima frente ao calor é mostrada na tabela VI e figura 8. Através da curva obtida pode-se observar que a enzima é altamente estável, e até ativada, quando submetida a 40°C por 60 minutos. A 50°C ela perde somente cerca de 37% da atividade, ao passo que a 60°C essa perda é da ordem de 94% após decorridos 60 minutos.

A tabela VII mostra o comportamento da enzima frente a dez reagentes químicos. A reação enzimática sem a adição de nenhum componente estranho foi considerada como padrão (100%). O cloreto de cálcio aumentou em 4% a atividade, ao passo que o cloreto de mercúrio e EDTA diminuíram acentuadamente a atividade enzimática.

TABELA V - Dados relativos a variação da atividade proteolítica específica de fígado de cangulo Balistes vetula Linnaeus em função do tempo e temperatura de incubação.

Tempo (min)	TEMPERATURA (°C)			
	40	50	55	60
	µg Tir/mg Prot.	µg Tir./mg Prot.	µg Tir./mg Prot.	µg Tir./mg Prot.
15	2.666,67	4.250,0	4.250,0	1.083,33
30	4.666,67	7.166,67	6.500,0	1.333,33
45	6.333,33	9.333,33	7.916,67	1.500,0
60	7.833,33	10.500,0	9.000,0	1.500,0

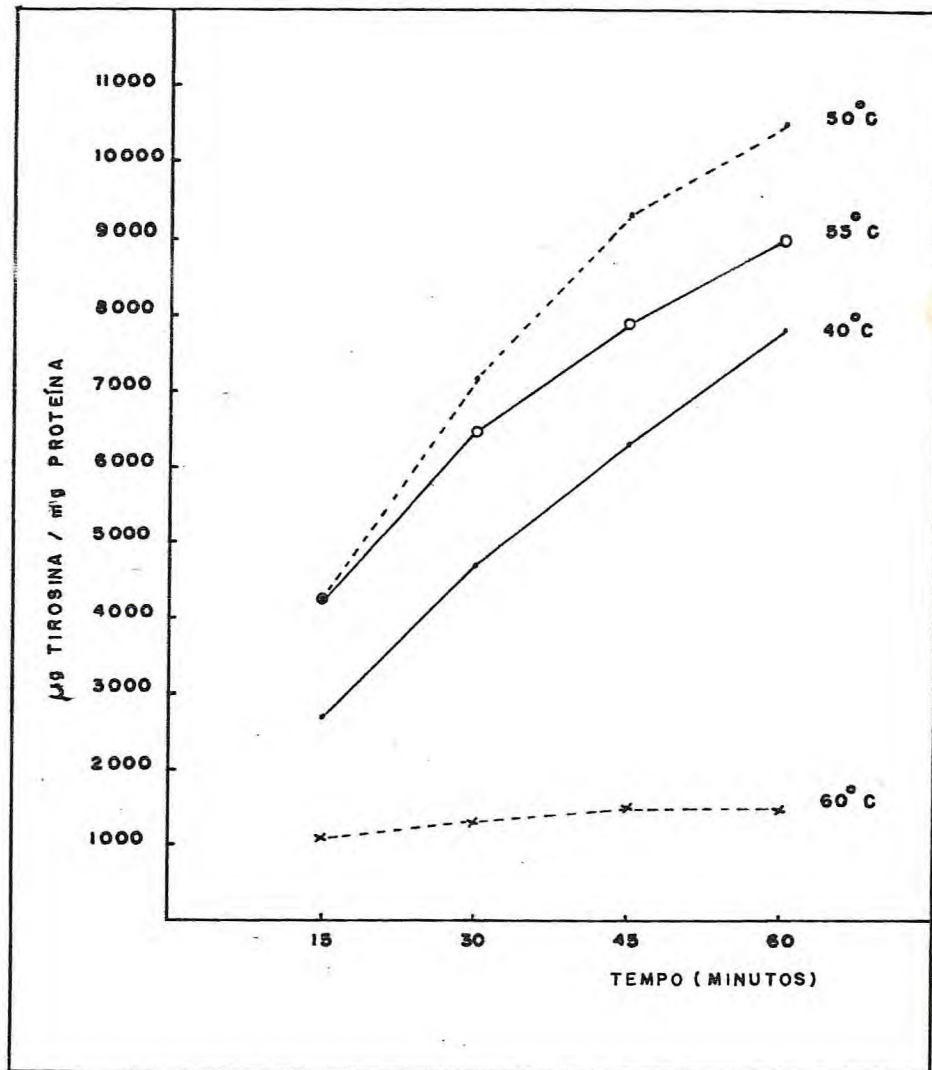


FIGURA 7 - Variação da atividade proteolítica específica de fígado de can-
gulo em relação ao tempo e temperatura de incubação.

TABELA VI- Variação percentual de atividade proteolítica específica no fígado de cangulo Balistes vetula Linnaeus em função do tempo e temperatura de aquecimento do extrato.

Tempo (min)	TEMPERATURA (°C)					
	40		50		60	
	µg tir./mg Pr.	% At	µg Tir./mg Pr.	% At	µg Tir./mg Pr.	% At
0	5.272,59	100	5.272,59	100	5.272,59	100
15	5.633,33	106,8	4.032,15	76,5	437,95	8,3
30	5.999,82	113,8	4.180,21	79,3	375,0	7,1
45	6.018,49	114,1	3.854,61	73,1	444,45	8,4
60	6.110,92	115,9	3.302,83	62,6	320,0	6,1

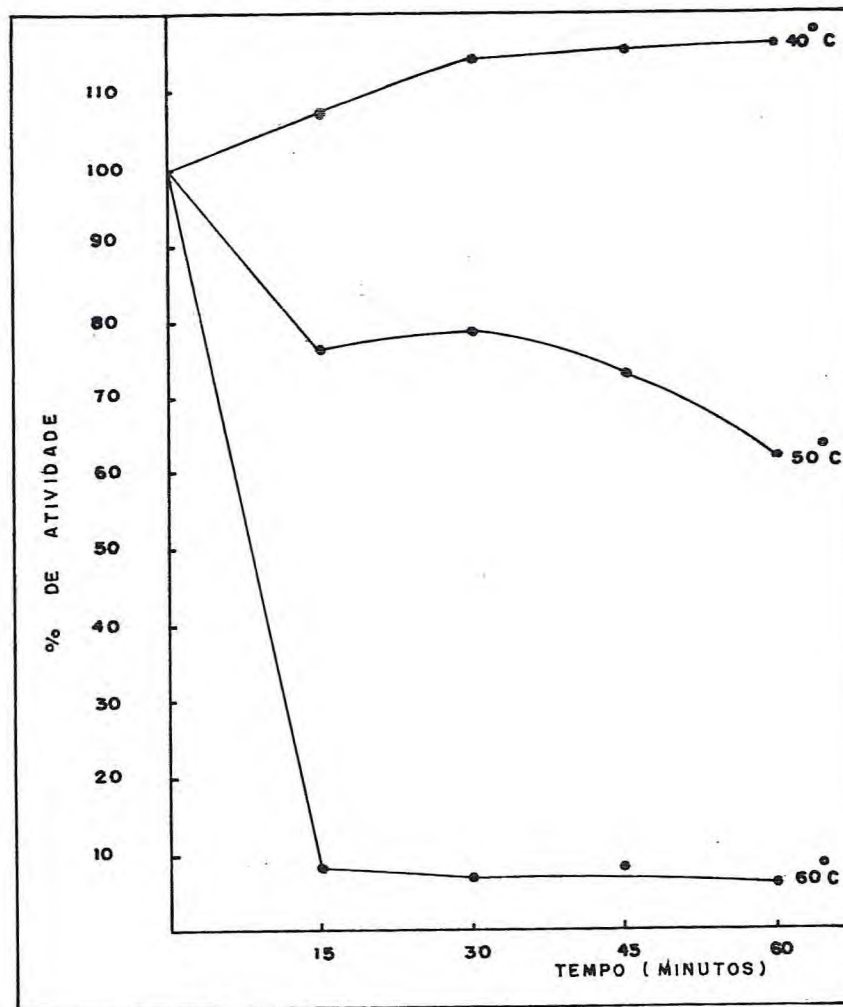


FIGURA 8 - Variação percentual da atividade proteolítica específica de fígado de cangulo em função do tempo e temperatura de aquecimento do extrato.

TABELA VII- Ação de compostos químicos sobre a atividade proteolítica específica em fígado de cangulo Balistes vetula, considerando 100% a atividade da enzima sem adição destes compostos.

ESPECIFICAÇÃO	Atividade proteolítica Específica (μ g Tir/mg Prot.)	% de Atividade
PADRÃO	7.421,21	100
Cloreto de Cálcio	7.737,00	104,26
Cloreto de Mercúrio	3.447,44	46,45
Cloreto de Sódio	7.368,58	99,29
Cloreto Férnico	6.842,25	92,20
EDTA	4.368,51	58,87
Cloreto de Manganês	7.184,36	96,81
Tiosulfato de Sódio	7.000,15	94,33
Ácido Ascórbico	7.394,89	99,65
Ácido Cítrico	7.315,94	98,58
2-mercaptoetanol	4.868,52	65,60

IV. DISCUSSÃO

Estudos com sistemas biológicos somente são possíveis com um controle rígido do pH do meio. As enzimas são altamente sensíveis a mudanças de pH; geralmente cada enzima requer um pH ótimo onde a atividade é máxima e as variações ocorrem em um limite muito estreito, tanto assim que o meio deve ser adequadamente tamponado. Para a caracterização de uma enzima é necessário, portanto, que se determine seu pH ótimo, relacionando-o com um substrato definido. Se uma enzima atua em mais de um substrato, o pH ótimo pode diferir para cada um deles.

O pH de máxima atividade proteolítica encontrado nos extratos oriundos de fígado de cangulo Balistes vetula foi de 8,5, para extratos brutos e 9,0 para os extratos parcialmente purificados com 60% de sulfato de amônia. Estes resultados estão de acordo com a maioria dos trabalhos sobre proteases de pescado, cuja variação do pH ótimo situa-se entre 7,0 e 9,0. Na faixa ácida o pH ótimo variou entre 2,8 a 4,0, mostrando entretanto uma atividade muito inferior aquela para a faixa alcalina (Tabela III, figuras 3 e 5). Essa baixa atividade do sistema proteolítico ácido torna desprezível e impróprio para ser utilizado como parâmetros para estudos fisiológicos e/ou bioquímicos. Contudo há estudos que têm demonstrado uma razoável atividade proteolítica na faixa ácida, como pode ser observada nos trabalhos de Lin et al. (1980) e Erickson et al. (1983), que encontraram em corvina e pescada uma enzima semelhante a pepsina.

As diversas espécies de peixes que demandam estudos, mostram que o pH ótimo de máxima atividade difere para cada espécie e substrato utilizado.

Makinodan & Ikeda (1969 a e b) estudando as proteases do músculo de pescado encontraram um pH ótimo de 2,8 - 3,0 para a hemoglobina e 8,0 para a caseína.

Erickson et al. (1983), por sua vez, encontraram no fluido sarcoplasmático da pescada do Pacífico (Merluccius productus) e bacalhau verdadeiro (Gadus macrocephalus) um pH ótimo entre 3,5 - 3,9 e 3,2 - 3,6, na faixa ácida e entre 7,1 - 7,2 e 7,7 - 8,0 na faixa alcalina, respectivamente, usando a hemoglobina como substrato.

A enzima do músculo de albacora (Germo alalunga) estudada por Groninger Jr. (1964) exibiu um pH ótimo de 2,4 - 2,5. Houve pouca atividade em pH inferior a 1,5 e superior a 4,0. Entretanto, a protease de Eetroplus suratensis estudada por Sundaram & Sarma (1960) apresentou máxima atividade entre 9,5 e 10,5. No ceco pilórico de salmão (Oncorhynchus tshawytscha) o pH ótimo para as proteases foi 9,0 (Croston, 1960).

Estudos de proteases em crustáceos têm revelado, na sua maioria, que as proteases alcalinas são as predominantes, que o pH ótimo situa-se em um intervalo mais amplo e que a atividade enzimática é mais alta do que aquela observada em peixes.

Asahara (1973) encontrou um pH ótimo igual a 8,5 para a proteinase de hepatopâncreas de camarão Trachypenaeus curvirostris usando caseína a 1% como substrato.

Em Penaeus japonicus Maugle et al. (1982a) encontraram uma atividade proteolítica estável entre pH 7,0 e 8,5, indicando provavelmente a presença de mais de uma protease alcalina com ação hidrolítica sobre a caseína. Galgani et al. (1984) compararam as proteases digestivas do Penaeus kerathurus e Penaeus japonicus e pesquisaram o pH ótimo na faixa de 6,0

a 11,0. Nenhuma atividade foi verificada abaixo de pH 6,0 e somente um amplo pico foi observado com um máximo em 8,5 e 9,0 e 9,0 e 9,5, respectivamente, para os referidos crustáceos.

Takahashi et al. (1964a) verificaram que a caseína foi rapidamente hidrolisada pelos extratos de hepatopâncreas e intestino de Panulirus japonicus, sendo muito lentamente hidrolisada pelo extrato de estômago. O pH ótimo foi observado entre 8,5 e 9,5 para o intestino e três pHs distintos foram observados no hepatopâncreas: 2,0 - 2,5; 8,5 - 9,0 e em torno de 11,5. Takahashi et al. (1964b) estudando dez espécies de pescado determinaram que a maioria dos animais apresentavam uma atividade proteolítica máxima nos pHs 2,5; 5,0 e 6,0 e somente duas espécies exibiram atividade máxima no intervalo de pH de 8,5 a 11,0.

DeVillez (1965) demonstrou dois picos ótimos de pH para a atividade de caseinase no suco gástrico de Orconectes virilis, um na faixa ácida com pH 6,0 e outro pico na faixa alcalina entre 7,5 e 8,5.

Sather (1969) encontrou atividade máxima da protease em pH 7,9 no caranguejo Podophtalmus vigil, enquanto Saker et al. (1982) encontraram uma atividade máxima em hepatopâncreas de jovens da lagosta Panulirus laevicauda no pH 7,0.

Os moluscos geralmente apresentam atividade mais elevada na faixa ácida. Sakai & Matsumoto (1981) verificaram elevada atividade proteolítica com o máximo de pH em 3,1 no músculo do manto da lula Ommastrephes sloanipacificus. O molusco bivalve Venerupis philippinarum apresentou um pico de atividade em pH 6,0 e alguma atividade pepsínica em pH 2,7 (Maugle et al., 1982b).

A remoção de água dos tecidos, pelo tratamento com acetona é um método excelente e amplamente utilizado na preparação de enzima (Keller et al., 1956; Prahl & Neurath, 1966; Gates & Travis, 1969; Reeck & Neurath, 1972; Holzman et al., 1982; Vo et al., 1983; Yoshinaka et al., 1983), principalmente porque conserva a atividade proteolítica por longo período de tempo. O pó acetônico do fígado de cangulo mostrou-se com estas características.

O processo de purificação através da adição gradual de sulfato de amônia tem sido amplamente utilizado para enzimas proteolíticas (Keller et al., 1956; Jónás et al., 1983).

A atividade proteolítica específica máxima detectada na fração 40-60% de saturação com o sulfato de amônia para o cangulo (Tabela II, figura 4), encontra-se dentro do intervalo verificado para a maioria das enzimas proteolíticas, o qual, em geral, varia de 30 a 80% (Croston, 1960; Sundaram & Sarma, 1960; Groninger Jr., 1964; Makinodan & Ikeda, 1969; 1969a e 1969b; Reeck & Neurath, 1972; Bauer & Eitenmiller, 1974; Murakami & Noda, 1981; Saker et al., 1982).

Para uma dada concentração de enzima sob condições padronizadas, a velocidade de reação inicial varia com o aumento da concentração de substrato até um certo limite, quando então passa a ser constante. Por conseguinte, em baixas concentrações de substrato, nem todas as moléculas de enzima se combinam com as de substrato, assim a máxima velocidade não pode ser alcançada para aquela quantidade de enzima. Em elevadas concentrações de substrato, todas as moléculas de enzima se ligam no complexo enzima-substrato e caso a concentração de substrato seja aumentada não poderá afetar a velocidade de reação.

Os resultados apresentados na tabela IV e figura 6, mostram uma grande afinidade entre a enzima e o substrato, uma vez que o nível de saturação do substrato ocorre na razão de 0,5ml do extrato diluído de 500 vezes para 50mg de caseína. Essa relação é semelhante àquela encontrada por Saker et al. (1982) para protease de hepatopâncreas de lagostas jovens Panulirus laevicauda.

Em proteases de albacora Germo alalunga a saturação de enzima foi obtida com aproximadamente 50mg de hemoglobina (Groninger Jr., 1964).

Para outros materiais biológicos os valores encontrados são inferiores aos observados para o cangulo (Prisco & Vieira, 1976; Ainouz et al., 1981; Vieira et al., 1985).

A natureza proteica das enzimas tem sido enfatizada e é refletida na relação entre a temperatura e a atividade enzimática. A medida que a temperatura se eleva, a atividade enzimática aumenta a tal ponto que a velocidade de reação é aproximadamente o dobro para cada 10°C de aumento da temperatura. Segundo Eskin et al. (1971) a grande maioria das enzimas mostra uma atividade ótima entre 30 e 40°C. A 45 - 50°C as enzimas começam a se desnaturar e em cerca de 50°C a enzima é inativada devido a desnaturação da apoenzima (porção proteica da enzima), que resulta no desdobramento da molécula e, conseqüentemente, perda de especificidade. Normalmente, a inativação térmica é muito rápida em temperaturas superiores a 50°C.

Em fígado de cangulo Balistes vetula Linnaeus a temperatura ótima foi de 50°C quando se procedeu a incubação a 60 minutos, usando-se a caseína como substrato (Tabela V, figura 7), dados que são confirmados por outros trabalhos realizados com extratos de órgãos de pescado.

Takahashi et al. (1964b) afirmam que a temperatura ótima para a hidrólise da caseína pelos extratos de fígado de peixes é geralmente 40 - 45°C em pH 2,5 e 50 - 55°C em pH 6,0; para o extrato hepático de Ommastrephes sloani pacificus a temperatura foi 40°C em pH 2,5 e 50°C em pH 6,0. A máxima hidrólise da caseína pelos extratos de fígado de Sepia esculenta e Octopus vulgaris foi mostrada a 30°C (pH 2,5) e a 50 - 55°C (pH 6,0), ao passo que para a Panulirus japonicus foram observadas 50 - 55°C (pH 2,5 e 9,0) e 40 - 45°C (pH 11,0). Dando continuidade aos estudos realizados com a Panulirus japonicus, Takahashi et al. (1964a) verificaram que a temperatura ótima para a hidrólise da caseína pelo extrato do intestino e fígado foi 50 - 55°C nos pHs 2,5 e 9,0 e 40 - 45°C no pH 11,5.

Entretanto Makinodan & Ikeda (1969) investigando doze espécies' de pescado mencionaram que a temperatura ótima para 4 horas de reação foi relativamente alta, 60 - 65°C para as proteases ativas na faixa de pH alcalino, em comparação com 45 - 50°C para as da faixa ácida.

Outros estudos com crustáceos têm sempre procurado demonstrar ' que existe uma relação muito estreita entre o tempo e a temperatura de in cubação. Eitenmiller (1974) encontrou que a temperatura ótima da catepsina presente no músculo de camarão Penaeus setiferus durante 4 horas de in cubação foi 42°C. Contudo, para a enzima preteolítica de hepatopâncreas' de camarão Trachypenaeus curvirostris, Asahara (1973) encontrou máxima ' atividade a 55°C por 60 minutos e, as enzimas digestivas do Penaeus japo- nicus apresentaram 40°C como sendo a melhor temperatura quando estas fo - ram incubadas por 30 minutos (Maugle et al., 1982a). Outros crustáceos de - cápodos foram estudados por Sather (1969) apresentando 37°C por 4 horas ' como sendo a melhor relação entre o tempo e a temperatura.

Na carpa, Makinodan & Ikeda (1969 a e b) estudaram as proteases ácidas e alcalinas e encontraram ótimos de 50°C por 1 hora e 65°C por 2 horas, respectivamente. Entretanto, nos estudos com cinco proteases isoladas de ceco pilórico e estômago de sardinha, Noda et al. (1982) observaram atividade máxima a 30°C por 24 horas, porém Murakami & Noda (1981), também estudando as proteases de órgãos digestivos de sardinha, incubaram a mistura de reação a 30°C por 20 minutos.

Lin et al. (1980) caracterizando as proteases de músculo e rim de pescado com substratos marcados com isótopo radioativo (¹⁴C) encontraram máxima atividade das proteases alcalinas no intervalo de 45 a 60°C por 60 minutos e Drucker (1972) também usando substrato marcado radioativamente, encontrou que a atividade proteolítica máxima ocorreu a 37°C por 30 minutos.

As enzimas apresentam uma característica muito importante referida como termoestabilidade. Normalmente um aumento de temperatura corresponde a um aumento de atividade enzimática até alcançar um tempo onde a desnaturação ocorre.

O sistema enzimático presente no fígado de cangulo pode ser considerado bastante estável ao calor, vez que somente quando submetido a 60°C por 60 minutos é que sua atividade diminui 94% (Tabela VI, figura 8). Este aspecto inerente ao sistema enzimático presente no fígado de cangulo confere certa segurança na preparação e manuseio do extrato enzimático, sem oferecer grandes riscos de inativação.

Alguns autores relacionam o efeito da temperatura com o tempo de aquecimento. Makinodan & Ikeda (1969a) mostraram que a 70°C por 10 minutos a atividade decresce para 50% e a 60°C por 30 minutos a perda é da ordem de 30% e, aproximadamente 80% quando submetida a 65°C por 30 minutos.

O efeito da temperatura estudado em proteases digestivas de Penaeus kerathurus por Galgani et al. (1984) mostra que a enzima permaneceu estável até 50°C durante 30 minutos, seguida de uma perda de atividade irreversível. Hara et al. (1984) verificando o mesmo efeito em proteases alcalinas F - I e F-II, notaram que a 50°C por 120 minutos, ambas perdem a atividade quase totalmente. Maugle et al. (1982 a) afirmaram que em temperaturas superiores a 40°C por 60 minutos havia uma perda considerável da atividade proteolítica.

As enzimas, de um modo geral, podem ter suas atividades modificadas quando em contato com certos compostos químicos, os quais podem inibir ou ativar as velocidades de reação.

O sistema enzimático existente no fígado de cangulo mostrou-se inibido quando na presença de cloreto de mercúrio, EDTA e 2-mercaptoetanol e ativado quando o cloreto de cálcio foi adicionado à reação. Resultados semelhantes foram encontrados por Galgani et al. (1984), os quais observaram que as proteases de Penaeus kerathurus foram ativadas por 1mM de CaCl₂ e inibidas em 20% na presença de 20 mM de EDTA.

Hara et al. (1984) comprovaram que 1 mM de CaCl₂ e NaCl aumentaram a atividade das proteases de rotíferos em 1 a 3% e 1 mM de HgCl₂, CuCl₂ e AgNO₃ diminuíram a atividade em 95, 63 e 72%, respectivamente.

Murakami & Noda (1981) observaram que as proteases I, II e III presentes nos órgãos digestivos da sardinha não foram inibidas nem ativadas pelos agentes quelantes de metais e reagentes sulfidrilas, entretanto elas foram fortemente inibidas pelo diisopropil fluorofosfato. O inibidor de tripsina presente na soja não afetou a enzima I, mas inibiu as demais.

Groninger Jr. (1964) observou que a atividade proteolítica registrada com hemoglobina como substrato também não foi afetada pelo inibidor de tripsina da soja e ovoalbumina a 0,01% nem pelo diisopropil fluorofosfato (DFP) a 10 mM. Entretanto, o p-cloromercuriobenzoato (p - CMB), iodoacetamida e N-metil maleimida a 1,4 mM, inibiram a atividade enzimática em 40, 20 e 20%, respectivamente.

Outros componentes como o fenil-metil-sulfonil-fluoreto (PMSF) e o p-CMB induziram a inibição e a ativação, respectivamente, em cada enzima das três espécies de peixe estudadas (Jónás et al., 1983).

Sundaram & Sarma (1960) verificaram que a enzima do Eetroplus suratensis não foi afetada pelos íons metálicos testados, mesmo em concentrações relativamente altas (0,01M), exceto para os íons de manganês (Mn^{+2}) que estimularam a atividade e os íons de ferro (Fe^{+3}) e zinco (Zn^{+2}) que inibiram ligeiramente a enzima.

V. CONCLUSÕES

1. A enzima em estudo apresentou um máximo de atividade proteolítica em pH 9,0 usando-se a caseína como substrato.
2. A temperatura ótima foi 50°C com o tempo de incubação de 60 minutos.
3. Na relação enzima-substrato foi estabelecida a razão de 50mg ' de caseína para 0,5 mililitro do extrato feito a partir de pó acetônico (1:500, p/v).
4. A enzima permaneceu estável a temperatura de 40°C por 60 minutos, entretanto perdeu 94% de atividade quando submetida a 60°C por 60 minutos.
5. A fração de purificação com sulfato de amônia, correspondente ' a 40-60% de saturação, foi a que apresentou maior atividade específica.
6. Por ordem decrescente a reação enzimática foi inibida por cloreto de mercúrio, etilenodiaminotretaacético (EDTA), 2-mercapto-etanol, cloreto férrico, tiosulfato de sódio, cloreto de manganês, ácido cítrico, cloreto de sódio e ácido ascórbico.
7. O cloreto de cálcio ativou a reação enzimática na ordem de 4%.

VI. SUMÁRIO

O presente estudo visa fornecer informações sobre a extração e caracterização de enzimas proteolíticas de fígado de cangulo Balistes vetula Linnaeus.

Os peixes foram adquiridos na praia do Mucuripe, pescados na costa de Fortaleza-Ceará, sendo os fígados retirados, imediatamente após sua chegada ao Laboratório de Ciências do Mar.

A matéria-prima foi repetidas vezes tratada com acetona e, finalmente secada a vácuo usando-se a mistura acetona-éter (1:1).

O extrato de pó acetônico assim preparado, foi homogeneizado em tampão fosfato 0,01M em NaCl 0,1M pH 7,0 na proporção de 1:50 (p/v) em banho de gelo e centrifugado por 30 minutos a 20.000 x g a 4°C. O precipitado foi desprezado e no sobrenadante determinou-se a atividade proteolítica e o teor de proteína.

A reação enzimática desenvolveu-se pela adição de 0,5ml do extrato a 5,0ml de hemoglobina bovina (Sigma) e caseína (segundo Hammarsten, E. Merck Ag. Darmstadt) a 1% em tampão citrato 0,1M, tampão fosfato 0,1M e tampão borato 0,5M, separadamente. A incubação ocorreu a 40°C durante 60 minutos, finda a qual a reação foi parada com 1,0ml de ácido tricloroacético a 40%. A leitura da absorbância a 750nm em espectrofotômetro Bausch & Lomb Spectronic 20 foi feita após a reação com o Folin.

O ótimo de pH encontrado inicialmente para a reação foi 8,5. Entretanto, após a purificação feita com 60% de sulfato de amônia sólido a reação atingiu o seu máximo em pH 9,0.

A melhor temperatura para o desenvolvimento da reação foi alcançada em 50°C durante 60 minutos de incubação.

A quantidade de substrato escolhida foi 50mg de caseína 1% para 0,5ml do extrato preparado na proporção 1:500 (p/v).

A enzima submetida a 40°C permaneceu estável, entretanto quando a temperatura foi elevada para 50 e 60°C a perda foi da ordem de 37 e 94%, respectivamente.

A enzima foi visivelmente inibida pela adição de cloreto de mercúrio, etileno diaminotetracético (EDTA) e 2-mercaptoetanol, na concentração de 1mM. Ácido cítrico, ácido ascórbico, tiosulfato de sódio, cloreto de manganês, cloreto férrico e cloreto de sódio inibiram levemente a reação enzimática.

O cloreto de cálcio 1mM ativou o sistema enzimático na ordem de 4%.

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 seridó. Ciênc. Cult., 24: 104, 1972.
- ASAHARA, M. - Studies on proteolytic enzyme in the liver of the shrimp, Trachypenaues curvirostris. Bull. Japan. Soc. Sci. Fish., 39 (9): 987-991, 1973.
- BAUER, B.A. & EITENMILLER, R.R. - A study of some kinetic properties of partially purified Penaeus setiferus arylamidase. J. Foods, Sci., 39: 10-14, 1974.
- 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.
- CANTAROW, A. & SCHEPARTZ, B. - Biochemistry. 4. ed. W.B. Saunders Company. Philadelphia & London, 1967, p. 209-256.
- COHEN, T.; GERTLER, A. & BIRK, Y. - Pancreatic proteolytic enzymes from carp (Cyprinus carpio) - I. Purification and physical properties of trypsin, chymotrypsin, elastase and carboxy peptidase B. Comp. Biochem. Physiol. 69B: 639-646, 1981.
- CROSTON, C.B. - Tryptic enzymes of chinook salmon. Arch. Biochem. Biophys., 89: 202-206, 1960.

- DAWSON, R.M.C.; ELLIOTT, D.C.; ELLIOTT, W.H. & JONES, K.M. - Data for Biochemical Research. 2.ed. Oxford University Press, 1969.
- DEVILLEZ, E.J. - Isolation of the proteolytic digestive enzymes from the gastric juice of the crayfish Orconectes virilis. Comp. Biochem. Physiol., 14: 577-586, 1965.
- DEVILLEZ, E. & BUSCHLEN, K. - Survey of a tryptic digestive enzyme in various species of crustacea. Comp. Biochem. Physiol., 21: 541-546, 1967.
- DRUCKER, H. - Sensitive radiochemical assay for proteolytic activities. Analyt. Biochem., 46: 598-603, 1972.
- 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. New York. San Francisco. London, 1971, p. 109-151.
- GALGANI, F.G.; BENYAMIN, Y. & CECCALDI, H.J. - Identification of digestive proteinases of Penaeus kerathurus (Forskål): a comparison with Penaeus japonicus Bate. Comp. Biochem. Physiol., 78B: 355-361, 1984.
- GATES, B.J. & TRAVIS, J. - Isolation and comparative properties of shrimp trypsin. Biochem., 8 (11): 4483-4489, 1969.

- 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.
- GRONINGER Jr., H.S. - Partial purification and some properties of a proteinase from albacora (Germo alalunga) muscle. Arch. Biochem. Biophys., 108: 175-182, 1964.
- HAËN, C. & GERTLER, A. - Isolation and amino-terminal sequence analysis of two dissimilar pancreatic proelastases from African lungfish Protopterus aethiopicus. Biochem., 13 (13): 2673-2677, 1974.
- 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.
- 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.
- 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.
- JÓNÁS, E.; RÁGYANSZKI, M.; OLÁH, J. & BOROSS, L. - Proteolytic digestive enzymes of carnivorous (Silurus granis L.), herbivorous (Hypophthalmichthys molitrix Val.) and omnivorous (Cyprinus carpio L.) fishes. Aquacult., 30: 145-154, 1983.
- KELLER, P.J.; COHEN, E. & NEURATH, H. - Purification and properties of procarboxypeptidase. J. Biol. Chem., 223: 457-467, 1956.

- KOZLOVSKAYA, E.P. & VASKOVSKY, V.E. - A comparative study of proteinases of marine invertebrates. Comp. Biochem. Physiol., 34: 137-142, 1970.
- 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. Journal Biol. Chem., 193: 265-275, 1951
- MAKINODAN, Y. & IKEDA, S. - Studies on fish muscle protease - I. On the existence of two kinds of proteinases 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, 1969a.
- 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, 1969b.
- MAUGLE, P.D.; DESHIMARU, O.; KATAYAMA, T. & SIMPSON, K.L. - Characteristics of amylase and protease of shrimp Penaeus japonicus. Bull. Japan. Soc. Sci. Fish., 48 (12): 1753-1757, 1982a.
- 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 (12): 1759-1764, 1982b.

- MENEZES, M.F. - Aspectos da biologia e biometria do cangulo Balistes vetula (Linnaeus) no nordeste do Brasil, Anais do II Congresso Brasileiro de Engenharia de Pesca, 1981.
- 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. Bioch. Biophys. Acta, 658: 17-26, 1981.
- NODA, M.; VO, V.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.
- PRAHL, E.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.
- RICK, W. - Methods of enzymatic analysis. 2 ed. Hans Ulrich Bergmeyer. Vol. 4. 1974. p. 1012-1024.
- SAKAI, H. & MATSUMOTO, J.J. - Proteolytic enzymes of squid mantle muscle. Comp. Biochem. Physiol., 68B: 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 hepatopân -

- creas de jovens da lagosta Panulirus laevicauda (Latreille). Arq. Ciên.Mar., 22 (1/2): 57-66, 1982.
- SATHER, B.T. - A comparative study of amylases and proteinases in some decapod crustacea. Comp. Biochem. Physiol., 28: 371-379, 1969.
- SIEBERT, G. - Aktivität eiweiss spaltender enzyme in fische Experientia, XIV: 65-66, 1958.
- SUDEPE - Estatística de Pesca. Relatório anual. Controle de desembarque. 1983.
- SUNDARAM, S. & SARMA, P.S. - Purification and properties of a protease from the gut of Etroplus suratensis. Biochem. J., 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, 1964a.
- 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, 1964b.
- TITANI, K.; SASAGAWA, T.; WOODBURY, R.C.; ERICSSON, L.H.; DÜRSAM, H.; KRAEMER, M.; NEURATH, H. & ZWILLING, R. - Amino acid sequence of crayfish (Astacus fluviatilis) trypsin. Biochem., 22: 1459-1465, 1983.
- TOMÁŠEK, V.; ŠŮRM, 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.

VIEIRA, G.H.F.; SILVA, L.C.; SAKER-SAMPAIO, S. & SAMPAIO, A.H. - Ensaio preliminar ao estudo das proteases em hemolinfa de jovens da lagosta Panulirus laevicauda (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.

YOSHINAKA, R.; SUZUKI, T.; SATO, M. & IKEDA, S. - Purification and some properties of anionic trypsin from the catfish pancreas. Bull. Japan. Soc. Sci. Fish., 49 (2): 207-212, 1983.

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.