

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

ENSAIO PRELIMINAR AO ESTUDO DAS PROTEASES
EM HEMOLINFA DE LAGOSTAS JOVENS DA ESPÉCIE
Panulirus laevicauda (Latreille).

Luiz Carlos da Silva

Dissertação apresentada ao Departamento
de Engenharia de Pesca do Centro de Ciências Agrá-
rias da Universidade Federal do Ceará, como par-
te das exigências para a obtenção de título de
Engenheiro de Pesca.

FORTALEZA / CEARÁ
JULHO/1982

Prof. GUSTAVO HITZSCHKY FERNANDES VIEIRA
Professor Orientador

COMISSÃO EXAMINADORA:

Prof. JOSÉ RAIMUNDO BASTOS
Presidente

Prof. CARLOS GEMINIANO N. COELHO

VISTO:

Prof. MOISÉS ALMEIDA DE OLIVEIRA
Chefe do Departamento

Prof^a. FRANCISCA PINHEIRO JOVENTINO
Coordenadora do Curso

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)

- S581e Silva, Luiz Carlos da.
Ensaio preliminar ao estudo das proteases em hemolinfa de lagostas jovens da espécie *Panulirus laevicauda* (Latreille) / Luiz Carlos da Silva. – 1982.
36 f. : il.
- Trabalho de Conclusão de Curso (graduação) – Universidade Federal do Ceará, Centro de Ciências Agrárias, Curso de Engenharia de Pesca, Fortaleza, 1982.
Orientação: Prof. Gustavo Hitzschky Fernandes Vieira.
1. Lagostas. I. Título.

CDD 639.2

AGRADECIMENTO

o professor Tereza
De modo particular agradecemos ao professor Gus-
e da engenharia de Pesca Fernando Albuquerque pelo
tavo Hitzschky Fernandes Vieira por sua/maneira labo-
riosa em nos orientar, além do grande incentivo dado
durante toda a nossa formação.
realização deste trabalho.

Aos funcionários do Laboratório de Ciências do
Mar que de alguma forma contribuíram para a realização
deste trabalho.

Jose Roberto
Sou grato também aos amigos Alexandre H. Sampaio
Francisco A. Pereira da Costa
e Silvana A. Saker, que colaboraram de sobremaneira pa-
ra que os objetivos deste trabalho fossem alcançados.

- Tereza Cristina ✓
- Fernando ✓
- Fran. ✓
- J. Roberto ✓
- Regina ✓

ENSAIO PRELIMINAR AO ESTUDO DA AÇÃO DAS PRÓTEASES EM HEMOLINFA DE LAGOSTAS JOVENS DA ESPÉCIE Panulirus laevicauda (Latreille).

INTRODUÇÃO

As lagostas do gênero Panulirus, White, constituem um dos principais produtos de exportação do Nordeste do Brasil, sendo o Ceará o maior produtor.

A espécie Panulirus laevicauda (Latreille), embora não seja a maior representante em termos quantitativos na exportação, é responsável por uma parcela bastante significativa, pois em 1981 contribuiu com 717 toneladas (CACEX - Banco do Brasil) de caudas exportadas pelas indústrias de pesca do Estado do Ceará.

Apesar da grande importância deste crustáceo para a economia nordestina, pouco são os estudos sobre o mesmo no que se refere a sua fisiologia e bioquímica. Praticamente, todo conhecimento científico a esse respeito é oriundo de outros países cujas condições ambientais são bastante distintas das que predominam na região nordestina.

O ser vivo é constantemente atingido por correntes de elementos químicos provenientes do meio exterior, apresentando reações químicas que caracterizam o próprio indivíduo. As transformações químicas que se processam no ser vivo são a origem de sua energia (Coutinho, 1966).

No reino animal, é o sangue um dos principais componentes corpóreos que, além de propiciar o transporte de material nutritivo para todo o organismo, é também um dos veículos de eliminação de cátabólitos.

Nos crustáceos o sistema circulatório é aberto e o sangue, mas precisamente chamado de hemolinfa, contém dois componentes básicos: o plasma e os corpúsculos. São funções básicas da hemolinfa o transporte de oxigênio, força tamponante, atividade osmótica e transporte de material nutritivo (Maynard, 1960).

O sangue é um tecido cujas características variam com o estado fisiológico do animal e responde prontamente às modificações do meio ambiente.

Obviamente, as trocas no sangue resultante da muda são decorrentes de várias outras trocas funcionais correlatas, tais como a absorção de água durante e depois da muda e a quantidade de substâncias estocadas nos tecidos (Maynard, 1960). Além do mais, a indicação dos fatores físicos e químicos como temperatura, pH, salinidade e demais condições ambientais estão envolvidos nas mudanças fisiológicas do indivíduo.

A hemolinfa dos crustáceos mostra uma grande variação de seus constituintes em relação ao ciclo de muda e, implicitamente, com o estado fisiológico.

Na hemolinfa os componentes mais estudados têm sido o fósforo (P), o cálcio (Ca) e o magnésio (Mg).

Apesar destes elementos serem os que apresentam maior variação em relação ao ciclo de muda (Travis, 1955), os componentes nitrogenados devem também sofrer marcadas modificações com os diversos estágios de muda, tendo em vista suas múltiplas funções no organismo.

O metabolismo destes compostos nitrogenados em hemolinfa de crustáceos tem sido pouco estudado. Pelos estudos de Stevens et alii. (1961), foram determinados 17 aminoácidos em hemolinfa de Homarus americanus, Homarus vulgaris e Cancer irroratus sendo que suas concentrações variavam com o estado fisiológico e nutricional do indivíduo. Outros estudos relacionam-se com a excreção de substâncias

nitrogenadas e com o metabolismo de aminoácidos (Baldwin, 1933; Roche et alii, 1952; Smith & Moses, 1960; Huggins et alii, 1967).

Quanto ao metabolismo protéico propriamente dito, relacionado à hemolinfa de crustáceos, muito pouco é encontrado na literatura, sendo concebido através de analogia com outros animais.

Segundo Allison & Cole (1940) e Clark & Burnet (1942) bita dos por Florkin (1960), na hemolinfa de Homarus gammarus (Linnaeus) estão presentes 3 componentes proteicos facilmente separáveis por eletroforese.

Nas células sanguíneas dos crustáceos já foram detectadas algumas enzimas tais como tirosinase (Blaagvret & Richter, 1938), amilase (Damboviceanu, 1932) e fosfatase (Roche & Latreille, 1934). Segundo Damboviceanu, 1929, estão ausentes na hemolinfa de crustáceos as enzimas oxidase, peroxidase, catalase e protease.

* O ciclo periódico do crescimento de crustáceos não é somente acompanhado por modificações periódicas no exoesqueleto, epiderme e hepatopâncreas, mas são acompanhadas também por marcadas alterações nos sangue e urina (Travis, 1955). Em consequência, pode-se admitir que as proteínas estruturais e enzimáticas devem variar profundamente com o estágio de muda.*

Segundo Travis (1955) e Passano (1960), podem ser identificados em lagosta, 4 estágios de muda: A, B, C e D, sendo que para cada estágio podem ser detectados vários sub-estágios. Os estágios A, B e C correspondem à pós-muda, enquanto que o estágio D corresponde à pré-muda.

O estágio A é imediatamente seguinte à muda. O exoesqueleto (nova carapaça) é de consistência de uma membrana macia. O animal não se alimenta. A duração é de 24 horas aproximadamente.

No estágio B ocorre o endurecimento preliminar do esqueleto

to, o qual atinge a consistência de um pergaminho. A carapaça fica rígida em certas regiões, enquanto que a região branquial permanece ainda mole. O animal também não se alimenta. A duração deste estágio é de 1 a 6 dias após a muda.

No estágio C, o esqueleto fica inteiramente duro, mas continua a engrossar durante grande parte do período. Este é um período de atividade alimentar e é o mais longo ciclo, durando aproximadamente do sétimo ao quinquagésimo primeiro dia após a muda, correspondendo aproximadamente a 44 dias. Durante o final do estágio C, as camadas da membrana e a camada principal da epiderme estão completas. O termo "intermuda" pode ser explicado para animais com o desenvolvimento completo do esqueleto, acontecendo no intervalo de dias entre duas mudas, isto é, 28 a 35 dias seguintes de uma muda e outra (Travis, 1955).

O estágio D é aquele em que o futuro novo esqueleto é progressivamente formado sob a velha carapaça. Este período dura aproximadamente de 10 a 14 dias, durante o qual o animal não se alimenta. A nova endocutícula é visível externamente por observação na região ventral do abdomen ou por quebra das antenas ou patas.

Segundo Passano (1960), a principal função do sangue na pré-muda é transportar material entre o integumento e o hepatopâncreas. Pode também agir como órgão de estocagem e como local de certas reações enzimaticamente controladas.

Considerando que a hemolinfa pode funcionar como órgão de estocagem (Passano, 1960), admitiu-se a possibilidade da presença de protease na hemolinfa mesmo conflitando com Damboviceanu (1929), que negou sua presença.

O presente trabalho visou, portanto, a investigar a presença de protease em hemolinfa de lagostas Panulirus laevicauda (Latre

MATERIAL E MÉTODOS

Para a realização do presente trabalho, utilizamos lagostas jovens da espécie Panulirus laeviscauda (Latreille). Os animais foram capturados na praia do Meireles e na praia do Farol, em Fortaleza, Ceará, e mantidos em aquários até o momento da retirada da hemolinfa. Antes da coleta da hemolinfa, foram determinados o estágio de muda e o comprimento zoológico.

A hemolinfa foi retirada de animais vivos, com os recipientes em banho de gelo, onde procuramos manter a temperatura em torno de 0°C, para assegurarmos a integridade do material. O líquido linfático foi obtido mediante um corte com tesoura na junção do abdômen com o cefalotórax, deixando-o escorrer por um funil até um becker, onde era agitado com o auxílio de um bastão de vidro, com a finalidade de evitar a coagulação.

Imediatamente, a hemolinfa foi centrifugada a 3.000 RPM em centrífuga refrigerada Internacional modelo PR-J durante 15 minutos. O sobrenadante foi diluído em tampão fosfato 0,01 M em NaCl 0,1 M (pH=7,0), na proporção de uma parte de sobrenadante para 9 de tampão (v/v) e conservado em congelador até a hora de sua utilização. O precipitado foi desprezado.

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

Utilizamos somente indivíduos no estágio C nos ensaios pH ótimo, relação enzima-substrato, tempo e temperatura, termo-estabilidade e purificação de proteínas com sulfato de amônia.

Nos extratos foram determinados o teor de proteína e a atividade proteolítica.

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

A atividade proteolítica foi considerada como a capacidade que a enzima possui de hidrolizar caseína.

A reação enzimática realizou-se entre o extrato de hemo-- linfa (1:10, v/v) e a solução de caseína (segundo Hammarsten, E. Merck AG Darmstadt) a 1% em tampão fosfato 0,01 M em NaCl 0,1 M (pH=7,0). A incubação desenvolveu-se em uma temperatura de 50°C por um período de 45 minutos. Parou-se a reação com 1,0 ml de ácido tricloro acético (TCA) a 40% (Ainouz et alii, 1972). Após 15 minutos de repouso, a mistura foi filtrada em papel de filtro quantitativo Framex, faixa branca, de 12,5 cm de diâmetro, sendo a atividade proteolítica determinada na fração solúvel em TCA e medida pela absorbância a 750 nm em espectrofotômetro Varian Techtron modelo 635 k, depois da reação com o reagente de Folin (Lowry et alii, 1951). O tempo zero ou branco da reação foi obtido pela adição de substrato após ter sido adicionado TCA a 40%. Todos os valores de densidade ótica das amostras foram subtraídos dos valores dos brancos. A unidade de atividade corresponde à variação de 0,1 de densidade ótica. A atividade proteolítica foi expressa em unidade de atividade por mililitro (ml) e a atividade específica determinada pela divisão da atividade proteolítica pelo conteúdo de proteína em miligrama por mililitro.

A determinação do pH ótimo desenvolveu-se adicionando-se 0,25 ml do extrato e 8,0 ml de caseína 1% em tampão fosfato 0,01 M em cloreto de sódio (NaCl) 0,1 M nos seguintes pHs : 6,0; 6,5; 7,0; 7,5; 8,0; 9,0 e 10,0, totalizando um volume final de 10 ml. A

caseína também foi preparada nos respectivos pHs. A reação enzimática foi desenvolvida como descrita no parágrafo anterior e os resultados expressos em unidade de atividade por mililitro ($\text{U.A.} \times \text{ml}^{-1}$).

Na determinação do tempo e temperatura ótimos utilizamos as mesmas quantidades de extrato e caseína utilizadas na determinação do pH. O extrato e o substrato foram incubados nas temperaturas de 40; 45 e 50°C, durante períodos de 15; 30; 45; 60 e 90 minutos. A reação enzimática foi desenvolvida da mesma maneira que os demais ensaios e os resultados também foram expressos em $\text{U.A.} \times \text{ml}^{-1}$.

Para a determinação da melhor concentração de substrato a ser utilizada, foi desenvolvida uma reação onde a concentração do substrato variou de 10 a 86 mg de caseína, conservando-se o volume do extrato constante em 0,25 ml. A reação enzimática foi idêntica às anteriores, assim como a apresentação dos resultados, ou seja, em unidade de atividade por mililitro ($\text{U.A.} \times \text{ml}^{-1}$).

A termo-estabilidade foi determinada submetendo-se 0,5 ml do extrato à temperatura de 40 e 60°C, durante um período de tempo que variou de zero a 60 minutos. Após cada tempo o extrato era retirado e submetido a reação enzimática descrita para os ensaios anteriores, onde era determinada a atividade proteolítica. Os resultados foram expressos em unidade de atividade por mililitro ($\text{U.A.} \times \text{ml}^{-1}$) sendo transformados em porcentagem de atividade, relativa ao extrato não submetido ao calor, cuja atividade foi considerada 100%.

Na purificação, o sulfato de amônia sólido foi gradualmente adicionado ao extrato para 20% de saturação e o precipitado foi removido por centrifugação a 20.000 x g por 15 minutos em centrífuga International, modelo HT, à temperatura em torno de 4°C. O sobrenadante resultante desta primeira centrifugação foi utilizado para as precipitações subsequentes com 40; 60; 80; e 100% de satura-

ção com sulfato de amônia $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$. Os precipitados obtidos foram suspensos em tampão fosfato 0,01 M em NaCl 0,1 M (pH=7,0) e dializados contra água destilada deionizada durante um período de tempo suficiente para que a água apresentasse reação negativa com hidróxido de bário. Os precipitados foram convencionados de P_1 , P_2 , P_3 , P_4 , e P_5 correspondendo, respectivamente, as precipitações 0 - 20, 20 - 40, 40 - 60, 60 - 80 e 80 - 100% com $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$. As frações S_1 e S_2 , correspondem aos sobrenadantes do extrato bruto e sobrenadante da fração 80 - 100%, respectivamente.

Foi determinada a concentração de proteína e desenvolvida a reação enzimática em todas as frações para obtenção das atividades proteolíticas. Os resultados foram expressos em miligrama de proteína por mililitro para o conteúdo de proteína e em U. A.xmg. proteína⁻¹ para as atividades específicas.

A atividade proteolítica, após determinadas as condições ótimas, foi desenvolvida para extrato de hemolinfa de lagostas em vários estágios de muda e por classe de comprimento, onde também foi determinada a concentração de proteína pelo método do Micro-biureto (Goa, 1953).

RESULTADOS

Na tentativa de determinarmos as condições ótimas de ensaio da atividade proteolítica em hemolinfa de lagostas jovens da espécie Panulirus laevicauda (Latreille), determinamos vários parâmetros; entre eles pH, tempo e temperatura de reação, relação enzima-substrato, bem como a estabilidade do sistema enzimático em relação à temperatura.

Os resultados dos ensaios alcançam um máximo de atividade proteolítica em pH 7,0 e pH 9,0, tendo o segundo apresentado uma atividade menor, cerca de 87,6% de atividade apresentada no pH 7,0 (Tabela I, Figura 2).

Com relação a temperatura e o tempo de incubação, observamos que a atividade aumentou com a temperatura e tempo, até os 45 minutos iniciais. A partir dos 60 minutos, a atividade permaneceu mais ou menos constante nas diversas temperaturas de incubação. O ponto máximo de atividade considerado foi na temperatura de 50% e no tempo de 45 minutos. (Tabela III, Figura 4), condições escolhidas para os ensaios posteriores.

Com a finalidade de desenvolver a reação enzimática na presença ao excesso de substrato, determinamos a relação enzima-substrato. Pelos valores obtidos e a conformação da curva, ficou estabelecida uma relação de 80 mg de substrato (caseína 1%) para 0,25 ml do extrato, em um volume total de 10,0ml (Tabela II, Figura 3).

O extrato quando submetido a aquecimento em temperatura de 40°C, apresentou um aumento de sua atividade proteolítica com o tempo de incubação. Entretanto, na temperatura de 60°C, o sistema en

zimático diminuiu de atividade em relação ao tempo de incubação , atingindo um decréscimo máximo em 60 minutos (Tabela IV, Figura 5), cuja perda de atividade atingiu 25%.

Os resultados referentes a atividade proteolítica e concentração de proteína em relação ao ciclo de muda de lagosta jovem Panulirus laevicauda (Latreille), devem ser considerados preliminares e, como tal, sujeitos a revisão.

O conteúdo de proteína solúvel apresentou um pico de mínimo no estágio B e um acrécimo em C, D, atingindo neste último o pico máximo. A atividade proteolítica específica apresentou-se de forma crescente de A para D, sendo o mínimo em A e o pico de máximo em D (Tabela V, Figura 6 e 9).

Os resultados referentes a atividade proteolítica específica em relação às classes de comprimento, apresentaram um máximo na classe de 7-8 cm e mínimo na classe de 5-6 cm. O conteúdo de proteína solúvel apresentou-se de modo não uniforme nas diversas classes de comprimento (Tabela VI, Figura 7 e 10).

A purificação do sistema enzimático apresentou uma atividade máxima, para o pH 7,0, na fração 20-40% de saturação com sulfato de amônia. Neste intervalo, a atividade aumentou de 1,7 vezes em relação ao extrato bruto, havendo uma recuperação de 5,0%. Para a atividade no pH 9,0, os resultados foram semelhantes, sendo que a atividade máxima na fração 20-40% foi superior àquela verificada para o pH 7,0, assim como a relação purificação extrato bruto foi de 2,8. (Tabela VII, Figura 8).

DISCUSSÃO

A atividade proteolítica em sangue (hemolinfa) da crustá ceos tem sido pouco estudada e há autores que afirmam ser nula na maioria deles (Florkin, 1960). Portanto, este trabalho inicia por constatar a presença de proteases em hemolinfa e, em consequência determina as condições ótimas para sua atividade.

Dois picos de atividade são encontrados, um em pH 7,0 e outro de menor intensidade, no pH 9,0, podem sugerir a presença de duas proteases na hemolinfa de lagostas jovens, capazes de hidrolizar a caseína. É bem conhecido que várias enzimas proteolíticas têm seu pH ótimo no intervalo de 6 a 9 (Degkwitz, 1957; De Villez, 1965), sendo estas no entanto de origem gástrica.

A presença de protease na hemolinfa é bastante justificável, visto que, este tecido é o encarregado de conduzir substâncias nutritivas para os locais de crescimento da lagosta.

A temperatura ótima de incubação a 50°C situa-se dentro do intervalo de temperatura encontrado para proteases de tecidos de organismos marinhos (Stern & Lockhart, 1953; Dabrowski & Glogowski, 1977).

A saturação da enzima ocorreu com relação de 0,25 ml do extrato para 80 mg de substrato (caseína), evidenciando uma grande afinidade entre enzima e substrato. Essa saturação da enzima, em outros materiais biológicos, tem ocorrido com menor quantidade de substrato (Vieira, 1976; Ainouz, 1972).

Uma outra característica favorável ao sistema enzimático extraído da hemolinfa de lagostas jovens, é sua resistência ao ca

lor. A exposição do extrato a 40°C provocou um aumento de sua atividade em torno de 15%, apresentando uma inibição, quando a temperatura foi de 60°C; de 25% em comparação com o extrato bruto. Esta resistência de se inativar confere ao sistema enzimático uma característica muito importante, porque poderá ser trabalhado ~~sem~~ grande preocupação quanto a sua inativação.

A fração correspondente à precipitação de 20-40% como sulfato de amônia apresentou uma atividade proteolítica máxima, correspondendo a 1,7 vezes àquela apresentado pelo extrato bruto e uma recuperação de 5%. Proteases de outros tecidos tem apresentado uma atividade máxima na fração 40-60% de saturação com sulfato de amônia. Considerando os dados de purificação da enzima e sua recuperação, pode-se admitir este tratamento com sulfato de amônia como a primeira etapa na marcha da purificação do sistema enzimático em estudo.

O comportamento de protease e de proteína de hemolinfa de lagosta em relação ao ciclo de muda ainda não está bem definido, mesmo porque são poucos os estudos que se ocupam com o problema.

Em Panulirus argus (Latreille), Travis (1955) encontrou que a proteína da hemolinfa alcança um máximo de concentração no estágio D, sendo portanto semelhante aos dados apresentados na Tabela V, Figura 9. Observações semelhantes foram encontradas por Damboviceanu (1932) em Astacus e por Drilhon (1935) em Maia.

Paralelamente ao aumento de proteína no estágio D, houve também um aumento de atividade proteolítica neste estágio. A explicação para este fato pode-se baseiar em que no estágio C começa a estocagem de material de reserva no hepatopâncreas, o qual deverá ser mobilizado nos estágios em que a lagosta experimenta o je-

jum fisiológico (estágios D, A e B). Nestes estágios, as reservas seriam transportadas para os locais de muda através da hemolinfa que teria a necessidade de quebrar as moléculas maiores que seriam de proteínas.

Quanto ao tamanho da lagosta, parece que não há influência em relação à atividade proteolítica e à concentração de proteína. Bastos & Bezerra (1970) trabalhando com Panulirus argus e Panulirus laevicauda, também não observaram correlação entre proteína e tamanho do indivíduo. É viável que isto aconteça, uma vez que o crescimento da lagosta ocorre mediante o fenômeno de muda, o qual está presente em todo o período de vida da lagosta, com mais ênfase no período juvenil.

CONCLUSÃO

Excetuando-se as determinações referentes aos parâmetros do sistema enzimático, as conclusões relacionadas aos estágios de muda devem ser consideradas de caráter preliminar, e como tal, sujeitos a revisão, pois o número de amostras analisadas foi pequeno e portanto, não muito significativo.

1. O pH ótimo encontrado para a reação enzimática de proteases em hemolinfa de lagostas jovens da espécie Paranulirus laevicauda (Latreille) apresentou dois valores (pH 7,0 e 9,0).

A atividade apresenta no pH 9,0 foi cerca de 87,6 % da atividade apresentada no pH 7,0.

2. O tempo ótimo de incubação da reação enzimática foi de 45 minutos, enquanto a temperatura ótima foi de 50°C.
3. Na relação enzima-substrato, estabelecemos uma razão ótima de 80mg de substrato (caseína 1%) para 0,25 ml do extrato diluído em tampão fosfato (1:10) (v/v) , em um total de 10,0 ml.
4. A enzima foi ativada em 15% em relação ao extrato bruto quando incubada à temperatura de 40°C, e inibida em 25% quando incubada à temperatura de 60°C, atingindo este decréscimo máximo em 60 minutos.
5. A fração do extrato correspondente à purificação com sulfato de amônia ((NH₄)₂SO₄), no intervalo de 20 -

40% de saturação, foi a que apresentou maior atividade nos pHs 7,0 e 9,0 de reação.

6. A fração 20-40% apresentou uma purificação de 1,7 vezes em relação ao extrato bruto, com uma recuperação de 5% no pH 7,0. Para o pH 9,0 a purificação foi de 2,8 vezes e a recuperação, também de 5%.
7. Para o conteúdo de proteína solúvel em relação ao ciclo de muda, o pico de máxima concentração foi no estágio D, enquanto o pico de mínimo no estágio B, crescendo de C para D.
8. O máximo de atividade proteolítica específica em relação ao ciclo de muda foi encontrado no estágio D e o minimo no estágio A.
9. O máximo de atividade proteolítica específica em relação às classes de comprimento foi encontrado na classe de 7-8 cm, enquanto que o mínimo, na classe 5-6 cm.
10. O conteúdo de proteína solúvel, relativo às classes de comprimento, não apresentou uniformidade, não existindo portanto, relação entre classe de comprimento e conteúdo de proteína.

SUMÁRIO

O presente estudo objetivou desenvolver ensaios preliminares ao estudo da ação das proteases em hemolinfa de lagosta jovens da espécie Panulirus laevicauda (Latreille).

As lagostas foram capturadas nas praias do Meireles e do Farol, Fortaleza, Ceará, e colocadas em aquários até a retirada da hemolinfa.

Foram desenvolvidos vários ensaios, onde determinamos os parâmetros básicos ao estudo, como pH, tempo e temperatura de reação, relação enzima-substrato, bem como a estabilidade do sistema enzimático.

Utilizando-se os parâmetros ótimos, foram desenvolvidos, em caráter preliminar, os ensaios da atividade proteolítica com os estágios de muda e as classes de comprimento, para as lagostas no estágio "C".

O método de determinação do conteúdo de proteína solúvel utilizado foi o do Micro - Biureto (Goa, 1953). Os estágios foram determinados segundo Drach, 1939 e a atividade proteolítica como a capacidade de hidrolizar caseína. A reação enzimática realizou-se entre o extrato de hemolinfa (1:10) (v/v) e a solução de caseína 1% em tampão fosfato 0,01 M em NaCl 0,1M (pH 7,0). A incubação durou 45 minutos a 50°C de temperatura. Utilizou-se TCA a 40% (Ainouz et alii, 1972), para parar a reação. Após 15 minutos de repouso, a mistura foi filtrada e a absorbância medida a 750 nm em espectrofotômetro Varian Techtron Modelo 635, depois da reação com o reagente de Folin (Lowry et alii, 1951).

O pH ótimo para a reação enzimática apresentou dois valores: pH 7,0 e pH 9,0.

A temperatura ótima encontrada foi de 50°C enquanto o tempo ótimo para a reação foi de 45 minutos.

A enzima foi ativada a uma temperatura de 40°C e inibida a 60°C, atingindo um decréscimo máximo em 60 minutos.

A razão ótima da relação enzima-substrato foi de 80 mg de caseína 1% para 0,25 ml do extrato diluído em tampão fosfato 0,01 M em NaCl 0,1M (pH 7,0).

A purificação com sulfato de amônia apresentou uma maior atividade proteolítica na fração de 20-40% de saturação, tanto em pH 7,0 como em pH 9,0.

O pico de máxima concentração do conteúdo de proteína solúvel, em relação ao ciclo de muda, foi no estágio D e o mínimo no estágio B.

A atividade proteolítica apresentou, em relação ao ciclo de muda, um máximo de atividade no estágio D e mínimo no estágio A.

O máximo de atividade proteolítica específica, em relação às classes de comprimento, foi encontrado na classe de 7-8 cm, enquanto o mínimo na classe 5-6 cm.

O conteúdo de proteína solúvel não apresentou nenhuma relação com as classes de comprimento.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALLISON, J. B. & COLE, W. H. - 1940 - The nitrogen, copper, and hemocianin content of the sera of several arthropods. J. Biol. Chem, Baltimore, 135: 259-266.
- + AINOUIZ, I. L., XAVIER FILHO, J. & GOMES FILHO, E. - 1972 - Atividade proteolítica em sementes de Vigna sinensis cv seridô. Cien. e Cult. 24:104.
- BALDWIN, E. - 1933 - Phosphagen. Biol. Rev. Cambridge Phil. Soc. 8, 74-105.
- BASTOS, J. R. & BEZERRA, R. C. - 1970 - Copper and protein in the hemolymph of the spiny lobsters (Crustacea: Panularidae). Arq. Cien. Mar, 10(2):143-145.
- BOYER, P. D. - 1970 - The Enzymes - New York, Academic Press, Inc.
- CAMIEN, M. N., SARLET, H., DUCHÂTEAU, G., and FLORKIN, M. - 1951 - Protein acids in muscle and blood of marine and freshwater Crustacea. J. Biol. Chim. 193: 881-885.
- CLARK, E., and BURNET, F. M. - 1942 - The application of the sirological method to the study of Crustacea. Australian, J. Exptl. Biol. Med. Sci. 20: 89-95.
- CONN, E. E. & STUMPF, P. K. - 1975 - Introdução à bioquímica. 3ª Edição. Ed. Edgard Blucher Ltda. São Paulo.
- COUTINHO, R. - 1966 - Noções de fisiologia da nutrição. Rio de Janeiro. Edições O Cruzeiro.
- * DABROWSKI, K. & GLOGOWSKI, J. in print. Studies on the proteolytic enzymes of invertebrates constituting fish food. Hidrobiologia, 1977.

↙ DAMBOVICEANU, A. - 1929 - Recherches sur les constantes physico-chimiques du plasma des Invertébrés à l'état normal et en cours d'immunization. I. Constantes du plasma de quelques Crustacés Décapodes à l'état normal. Arch. roumaines pathol. exptl. microbial. 2: 5-38.

DAMBOVICEANU, A. - 1932 - Composition chimique et physico-chimique du liquide cavitaire chez les Crustacés Décapodes (physiologia de la calcification). Arch, roumaines pathol. exptl. microbiol. 5: 239-309.

DEGKWITZ, E. - 1957 - Ein Beitrag zur natur du proteolytischin veranungsferment bei verachindenen Crustaceenatur. Veroff Inst. Muresforsch. Bremerk. 5, 1-13.

3* DE VILLEZ, E. J. - 1975 - Observations on the proteolytic enzymes in the digestive fluid of the barnacle Balanus nubilus. Comp.* Biochim. Physiol. Vol. 51-A: 471-474.

+ DRACH, P. - 1939 - Mue et cycle d'intermue chez les Crustacés Décapodes. Ann. Inst. Oceanografie, 19: 103-391.

DRILHOM, A. - 1935 - Étude biochimique de la mue chez les crustacés. Ann. Physiol. et Physicochim. Biol. 11: 301-326.

FLOKIN, M. - 1960 - Blood Chemistry. Em: The Physiology of Crustacea. TH. Naterman ed. Vol. I: 141-154. Academic Press, New York.

X GOA, J. - 1952 - A micro biuret method for protein determination. Determination of total protein in cerebrospinal fluid. Scand. J. Clin. Lab. Invest. 5: 218-222.

HUGGINS, A. K., RICK, J. T., and KERKUT, G. A. - 1967 - A comparative study of the intermediary metabolism of L-glutamate in muscle and nervous tissue. Comp. Biochim. Physiol. 21, 23-30.

- A
X/*
- LOWRY, O. H., ROSEBROUGH, N. J., FARR, A. L. & RANDALL, R. J. -
1951 - Protein measurements with the Folin phenol reagent. J.
Biol. Chim. 193: 265-275.
- MAYNARD, D. M. - 1960 - Circulation and Heart function. Em: The
Physiology of Crustacea. TH. Waterman ed. Vol. I: pp. 161-214.
Academic Press, New York.
- MCWHINNIE, M. A. & MOHRHERR, C. J. - 1970 - Influence of Eystalke
Factores, Intermolt cycle and Scason upon ¹⁴C Incorporation
into Protein in the Crayfish *Orconectes viriles*. Comp. Biochem.
Physiol. 34, 415-437.
- MUNDAY, K. A. & HUGGINS, A.T. - 1968 - Crustacean Metabolism. Adv.
Comp. Physiol. Biochem. 3: 271-378.
- PASSAND, L. M. - 1960 - Molting and its control. Em: The Physiolo-
gy of Crustacea. T. H. Waterman, ed. Vol. I: 473-536. Acade-
mic Press, New York.
- RAW, I; COLLI, W - 1966 - Fundamentos de Bioquímica - Brasília -
Editora Universidade de Brasília.
- ROCHE, J., and LATREILLE, M. - 1934 - Sur les phosphatases du
sang et de l'hémolymphé. Compt. rend. soc. biol. 116:1033 --
1034.
- ROCHE, J., VAN THOAI, N., and GLAHN, P. E. - 1952 - Sur la L-ami-
noácideoxydase de nombreux invertébrés marins. 8:428-429.
- SKINNER, D. M. - 1962 - The structure and metabolism of a crusta-
cea integumentary tissue during a molt cycle. Biol. Bull. 123:
635-647.
- SMITH, M. J. H., and MOSES, V. - 1960 - Uncoupling agents and meta-
bolism. I. Effects of salicylate and 2:4 - dinitrophenol on the

incorporation of ^{14}C from labelled glucose and acetate into the soluble intermediates of isolated rat tissues. *Biochim. J.* 76: 579-585.

* 105 STERN, J. A. and LOCKHART, E. E. - 1953 - *J. Fisheries Research Board Can.* ~~10~~: 590-598 ~~10~~. 121

STEVENS, T. M., HOWARD, C.E., and SCHLESINGER, R. W. - 1961- Free amino acids in sera of the marine invertebrates, Cancer irroratus, Limulus polyphemus, Homarus americanus. *Comp. Biochim. Physiol.* 3: 310-314.

TRAVIS, D. F. - 1954 - The molting cycle of the spiny lobster, Panulirus argus (Latreille). I. Molting and growth in laboratory-maintained individuals. *Biol. Bull.* 107:433-450.

TRAVIS, D. E. - 1955 - The molting cycle of the spiny lobster Panulirus argus (Latreille). III. Physiological changes which occur in the blood and urine during the normal molting cycle. *Biol. Bull., Lancaster*, 109(3):484-503, 8 figs.

VIEIRA, G. H. F. & PRISCO, J. T. - 1976 - Effects of NaCl salinity on nitrogenous compounds and proteases during germination of Vigna sinensis seeds. *Physiol. Plant.* 36: 317-320.

5 A A STUDY OF THE PROTEOLYTIC ENZYME ACTIVITY OF THE PYLORIC CAECA OF REDFISH
J. Fish. Res. Bd.

TABELA I - Variação da atividade proteolítica em hemolinfa de lagosta jovem da espécie Panulirus laevicauda (Latreille), em função da variação do pH.

| pH | ΔA_{750} | U.A. x ml ⁻¹ |
|------|------------------|-------------------------|
| 6,0 | . 235 | 940 |
| 6,5 | . 255 | 1020 |
| 7,0 | . 365 | 1460 |
| 7,5 | . 320 | 1280 |
| 8,0 | . 305 | 1220 |
| 9,0 | . 315 | 1260 |
| 10,0 | . 240 | 960 |

TABELA II - Variação da atividade proteolítica em hemolinfa de lagosta jovem da espécie Panulirus laevicauda (La treille) em função da concentração de substrato.

| Concentração do substrato (mg Caseína/ml) | ΔA_{750} | U.A.ml ⁻¹ |
|---|------------------|----------------------|
| 10 | . 170 | 680 |
| 30 | . 440 | 1760 |
| 50 | . 615 | 2460 |
| 70 | . 665 | 2620 |
| 80 | . 680 | 2720 |
| 85 | . 630 | 2520 |

TABELA III - Variação da atividade proteolítica em hemolinfa de lagosta jovem da espécie Panulirus laevicauda (Latreille), em função da variação da temperatura e do tempo.

| Tempo (min) | Temperatura (°C) | | |
|-------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|
| | 40 | 45 | 50 |
| | U.A. x ml ⁻¹ | U.A. x ml ⁻¹ | U.A. x ml ⁻¹ |
| 15 | 220 | 265 | 425 |
| 30 | 425 | 480 | 570 |
| 45 | 560 | 610 | 625 |
| 60 | 640 | 660 | 615 |
| 90 | 660 | 700 | 640 |

TABELA IV - Variação da atividade proteolítica de hemolinfa de lagosta jovem Panulirus laevicauda (Latreille), mediante a prévia exposição do extrato a temperaturas de 40 e 60°C durante um período de tempo variado.

| Tempo (min) | Temperatura (°C) | | | |
|-------------|-------------------------|----------|-------------------------|----------|
| | 40 | | 60 | |
| | U.A. x ml ⁻¹ | % de At. | U.A. x ml ⁻¹ | % de At. |
| 0 | 565 | 100 | 575 | 100 |
| 10 | - | - | 565 | 98 |
| 15 | 590 | 104 | - | - |
| 20 | - | - | 545 | 95 |
| 30 | 600 | 106 | 525 | 91 |
| 40 | - | - | 480 | 83 |
| 45 | 635 | 112 | - | - |
| 50 | - | - | 450 | 78 |
| 60 | 650 | 115 | 430 | 75 |

TABELA V - Unidade de atividade proteolítica, atividade específica e quantidade de proteína solúvel em hemolinfa de lagosta jovem da espécie Panulirus laevicauda (Latreille), em função dos estágios de muda. Durante o ensaio usou-se caseína como substrato, pH 7,0; durante um tempo de 45 minutos e temperatura de 50°C.

| Estágios de muda | Nº de lagostas analisadas | U.A. x ml ⁻¹ | | | mg P x ml ⁻¹ | | | U.A. x mg Prot. ⁻¹ (*) | | |
|------------------|---------------------------|-------------------------|------|-------|-------------------------|-------|------|-----------------------------------|-------|-------|
| | | Mi | Ma | M | Mi | Ma | M | Mi | Ma | M |
| A | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| B | 4 | 10 | 120 | 52,5 | 23,3 | 36,0 | 31,6 | 0,29 | 5,14 | 1,94 |
| C | 17 | 40 | 1570 | 350,7 | 7,55 | 115,0 | 51,9 | 1,57 | 101,7 | 15,53 |
| D | 5 | 70 | 1580 | 948 | 19,9 | 82,3 | 57,4 | 0,85 | 44,8 | 21,36 |

Mi = mínimo

Ma = máximo

M = média

(*) - Atividade proteolítica específica

TABELA VI - Unidade de atividade proteolítica, atividade específica e quantidade de proteína solúvel em hemolinfa de lagosta jovem da espécie Panulirus laevicauda (Latreille), no estágio "C", em função das classes de comprimento. Usou-se caseína como substrato, pH 7,0, durante um tempo de 45 minutos e temperatura de 50°C.

| Classe de comprimento | Nº de lagostas analisadas | U.A. x ml ⁻¹ | | | mgPxml ⁻¹ | | | U.A. x mg Prot, ⁻¹ (*) | | |
|-----------------------|---------------------------|-------------------------|------|-----|----------------------|-------|------|-----------------------------------|-------|------|
| | | Mi | Ma | M | Mi | Ma | M | Mi | Ma | M |
| 5-6 | 2 | 272 | 290 | 281 | 37,7 | 63,46 | 50,6 | 4,6 | 7,2 | 5,8 |
| 7-8 | 2 | 220 | 330 | 275 | 7,55 | 85,8 | 46,7 | 2,6 | 43,7 | 23,1 |
| 9-10 | 8 | 40 | 1570 | 384 | 14,8 | 114,9 | 53,9 | 1,6 | 101,7 | 15,8 |
| 11-12 | 5 | 60 | 580 | 356 | 9,7 | 87,5 | 51,5 | 1,3 | 60,4 | 16,2 |

Mi = mínimo

Ma = máximo

M = média

(*) - Atividade proteolítica específica

TABELA VII - Dados relativos à purificação, com sulfato de amônia $((\text{NH}_4)_2\text{SO}_4)$, de protease da hemolinfa de lagosta jovem Panulirus laevicauda (Latreille). No ensaio, usou-se caseína como substrato, sendo a incubação à temperatura de 45°C durante 45 minutos.

| pH 7,0 | | | | | | pH 9,0 | | | | |
|-----------------------|-----------------------|-----------------------|---------------------|-----------------|----------------------|-----------------------|-----------------------|---------------------|-----------------|----------------------|
| Sulfato de Amônia (%) | U.Ax ml^{-1} | mgPx ml^{-1} | (*) U.A.mgP $^{-1}$ | Recuperação (%) | Vezes de Purificação | U.Ax ml^{-1} | mgPx ml^{-1} | (*) U.A.mgP $^{-1}$ | Recuperação (%) | Vezes de Purificação |
| 0 | 1440,0 | 37,73 | 38,16 | 100,0 | 1 | 1500 | 37,73 | 39,76/100% | 100 | 1 |
| 0 - 20 | 0,0 | 0,0 | - | - | - | 0,0 | 0,0 | - | - | - |
| 20 - 40 | 122,0 | 1,89 | 64,55/100% | 5,0 | 1,7 | 210,0 | 1,89 | 111,11/279% | 5,0 | 2,8 |
| 40 - 60 | 160,0 | 23,15 | 6,91/18% | 61,4 | 0,2 | 198,0 | 23,15 | 8,55 | 61,4 | 0,2 |
| 60 - 80 | 8,0 | 1,37 | 5,84 | 3,6 | 0,2 | 22,0 | 1,37 | 16,06 | 3,6 | 0,4 |
| 80 - 100 | 0,0 | 0,0 | - | - | - | 0,0 | 0,0 | - | - | - |

(*) - Atividade proteolítica específica.



Handwritten calculations and notes:

- $\frac{100}{2} = 50$
- $\frac{37,73}{1,89} = 19,96$
- $\frac{100}{1,89} = 52,91$
- $\frac{100}{1,37} = 72,99$
- 100
- 100
- 58

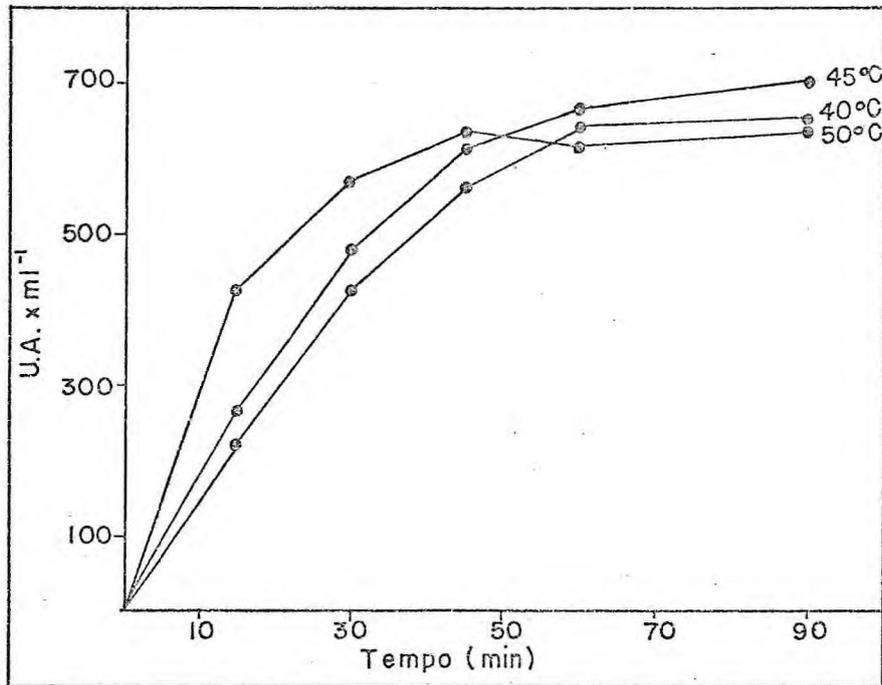


FIGURA 4 - Variação da atividade proteolítica em hemolinfa de lagosta jovem da espécie Panulirus laevicauda (Latreille), em função da variação da temperatura e do tempo.

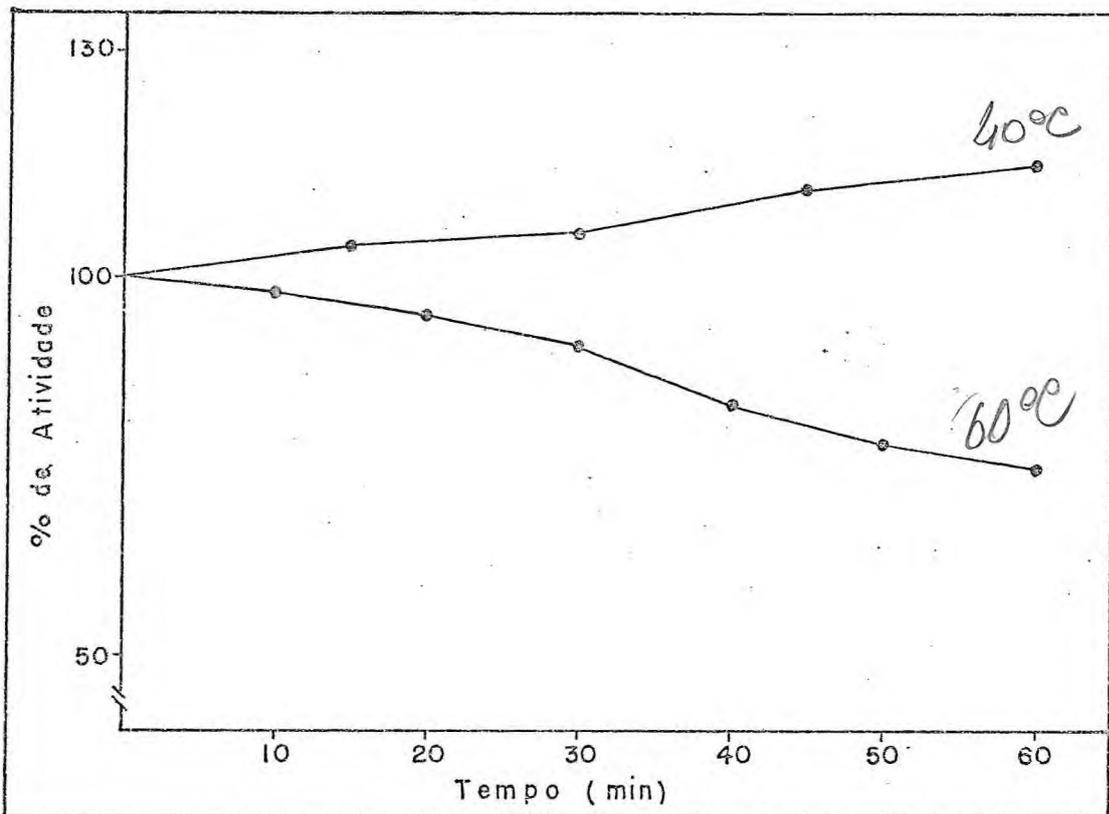


FIGURA 5 - Termo - estabilidade de protease em hemolinfa de la gosta jovem da espécie Panulirus laevicauda (Latreille).

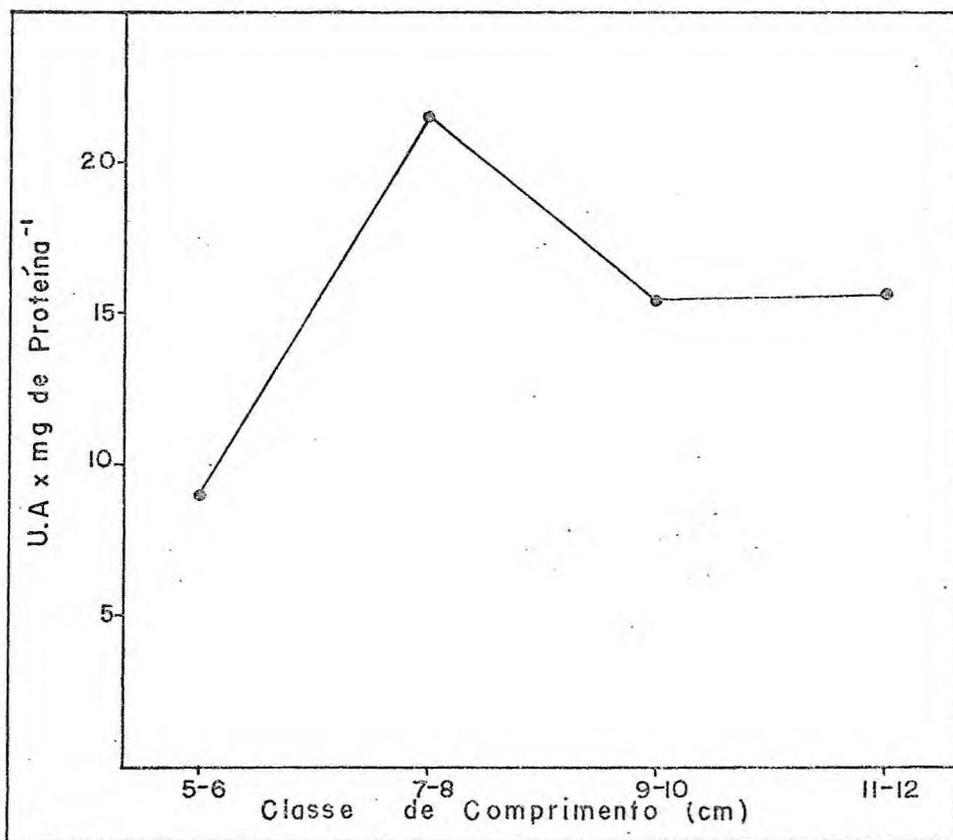


FIGURA 7 - Variação da atividade proteolítica específica em hemolinfa de lagostas jovens da espécie *Panulirus laevicauda* (Latreille), no estágio "C", em função do comprimento zoológico.

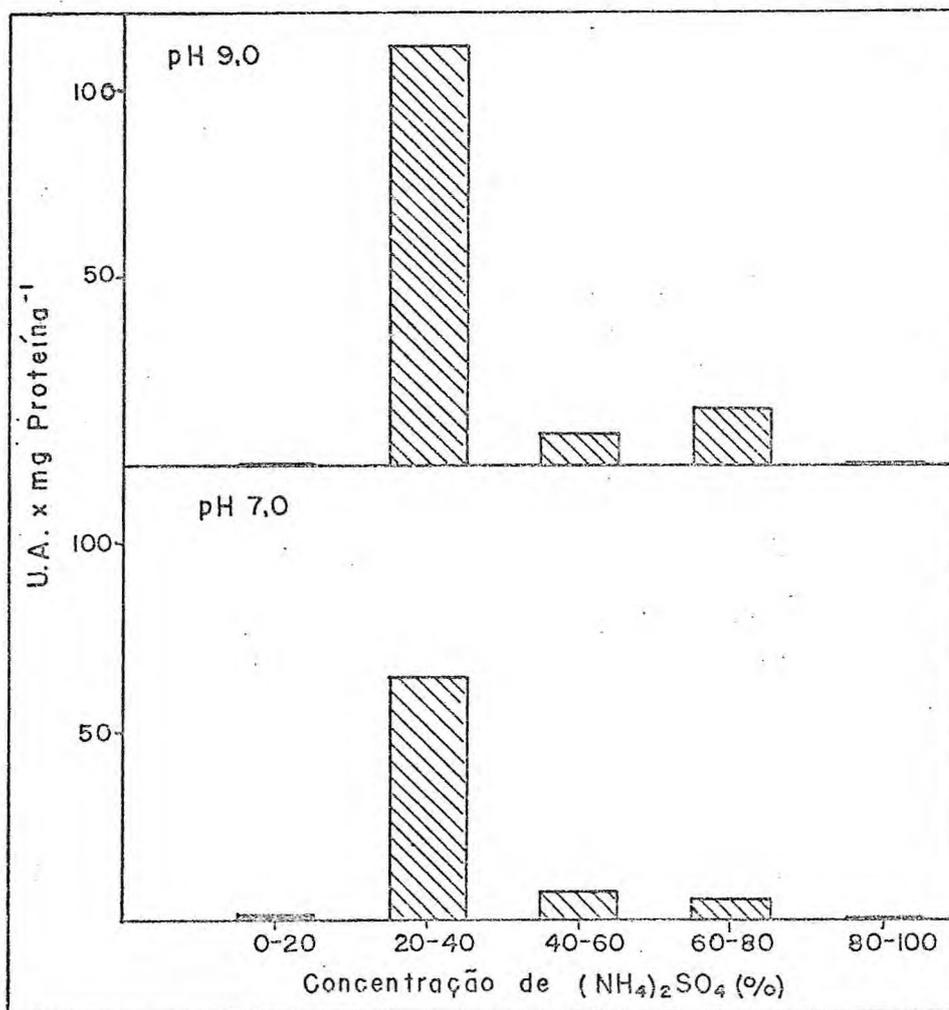


FIGURA 8 - Atividade proteolítica específica da hemolinfa de lagosta jovem da espécie Panulirus laevis da (Latreille), em relação com a sua saturação com sulfato de amônia.

Fazer

fig 6

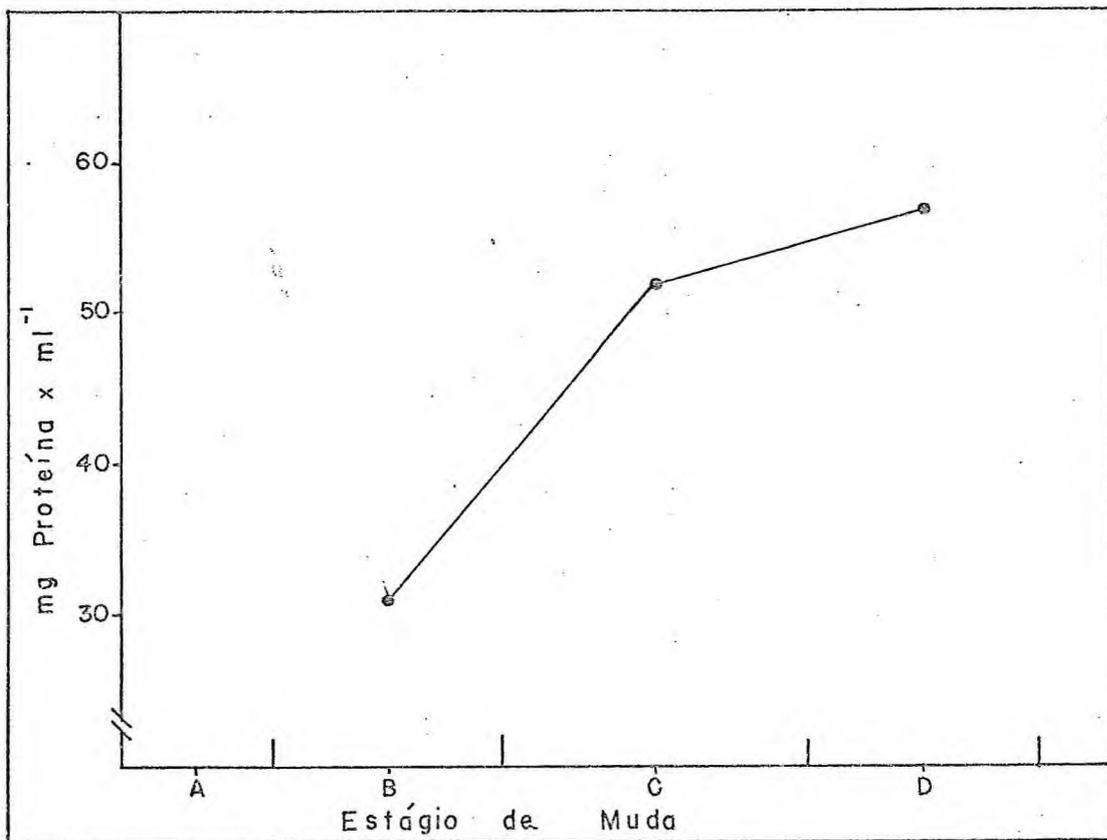


FIGURA 9 - Variação do conteúdo de proteína solúvel em homolinfa de lagostas jovens da espécie Panulirus laevicauda (Latreille), em função dos estágios de muda.

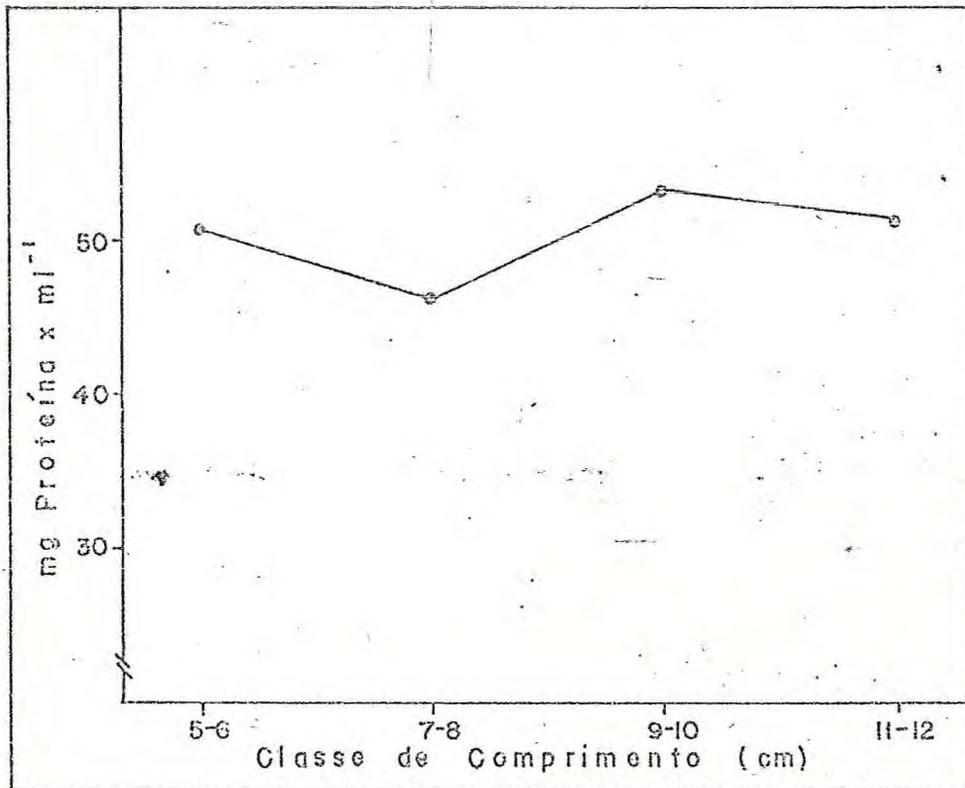


FIGURA 10 - Variação do conteúdo de proteína solúvel em hemolinfa de lagosta jovem da espécie Panulirus laevicauda (Latreille), no estágio "C", em função do comprimento zoológico.