

Proteases no trato digestivo de PEIXES

Tripsina do tambaqui (*Colossoma macropomum*), modelo alternativo para o aproveitamento de sub-produtos na indústria pesqueira

Ranilson de Souza Bezerra

Bolsista de Desenvolvimento Científico Regional – CNPq
Laboratório de Fisiologia e Ecologia de Peixes, Departamento de Pesca, Universidade Federal Rural de Pernambuco
ransoube@uol.com.br

Vera Lúcia Almeida Vieira

Professora Associada
Laboratório de Fisiologia e Ecologia de Peixes, Departamento de Pesca, Universidade Federal Rural de Pernambuco
vlav@st-andreus.ac.uk

Luiz Bezerra de Carvalho Jr

Professor Titular
Departamento de Bioquímica e Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami, Universidade Federal de Pernambuco
lbcj@bolink.com.br

Foto cedida pelos autores

Enzimas proteolíticas

As enzimas atuam como catalisadores biológicos de alta especificidade, desempenhando um papel fundamental na manutenção da vida. Por exemplo, elas são responsáveis pelo processamento de nutrientes de natureza macromolecular que têm monômeros importantes à economia do animal. Esse é o caso das enzimas proteolíticas, secretadas no lume do trato digestivo dos animais, que degradam as proteínas da dieta, de sorte que os aminoácidos e peptídeos possam ser melhor aproveitados por estes.

Enzimas proteolíticas, proteases, proteinases ou peptidases são sinônimos para as enzimas que hidrolisam ligações peptídicas (Barrett, 1994). Esses biocatalisadores podem ser classificados de acordo com a reação catalisada ou com o aminoácido estratégico do sítio catalítico. De acordo com a reação catalisada, dividem-se em exopeptidases e endopeptidases. As exopeptidases atuam próximo às extremidades das cadeias polipeptídicas. Enquanto que as endopeptidases atuam preferencialmente nas regiões internas das cadeias polipeptídicas. Quanto ao sítio catalítico, as exopeptidases dividem-se em: serinocarboxipeptidases, metalocarboxipeptidases e cisteinacarboxipeptidases. As endopeptidases dividem-se em serinoendopeptidases, cisteinaendopeptidases, asparticoendopeptidases, metaloendo-

peptidases e endopeptidases com mecanismo de catálise desconhecido (Barrett, 1994).

As serinoproteases, enzimas que possuem um mecanismo catalítico em comum, caracterizado pela presença de um grupamento serino no seu centro ativo, apresentam uma ampla distribuição entre os animais, onde são produzidas a partir de várias fontes e com diversas funções.

Em animais aquáticos, tripsina, quimiotripsina e elastase, que atuam em grupamentos lisina ou arginina, fenilalanina e elastina, respectivamente, compreendem, entre os teleosteos, as proteases do trato digestivo mais citadas e estudadas dessa família (Kolodziejaska & Sikorski, 1996; De Vecchi & Coppes, 1996).

Alguns substratos são utilizados para a determinação das atividades proteolíticas em extratos brutos e purificados. Proteínas como albumina, hemoglobina, fibrina, elastina, caseína, entre outras, são utilizadas como substratos não específicos, tendo em vista que essas possuem diversos sítios que podem ser hidrolisados por proteases de vários tipos de mecanismo. Por outro lado, existem os substratos específicos que são hidrolisados por enzimas específicas, como é o caso do benzoil arginina p-nitroanilida – BAPNA e o leucina p-nitroanilida (Tabela 1). Esses são substratos sintéticos específicos para determinar as atividades de tripsinas e aminopeptidases.

O efeito de inibidores fornece informa-

Tabela 1. Substratos específicos para proteases, inibidores e seus respectivos sítios de clivagem

Enzima	Sítio de clivagem	Substratos Sintéticos	Inibidores
Tripsina	Lado carboxílico da Lisina e Arginina	BAPNA 	EWTI; CmTI; TLCK; benzamidina
Leucina-aminopeptidase	Amino terminal de vários peptídios e proteínas	Leu-p-Nan 	Bestatina

ções confiáveis sobre o tipo catalítico de uma peptidase (Barrett, 1994). Alguns inibidores específicos para tipos catalíticos são mencionados na bibliografia e, entre eles, podemos citar: 3,4 DCI (dicloroisocumarina), PMSF (fluoreto de fenilmetilsulfonil) e DFP (diisopropil fluorofosfato), que são inibidores de serino-proteases; E64 (L-3-carboxitrans-2,3-epoxipropil-leucilamida-4-guanidino-butano) de cisteinaprotease; pepstatina A, um potente peptídico inibidor de asparticoproteases do tipo pepsina (Fig. 1.); 1,10 - fenantrolina de metalopeptidase etc.

Alguns inibidores são utilizados para identificar o mecanismo de ação de serino-proteases (Fig. 2). Entre eles podemos citar: fluoreto de fenilmetilsulfonil – PMSF, benzamidina, tosil fenilalanina clorometil cetona – TPCK, tosil lisina clorometil cetona – TLCK, além de inibidores de tripsina de origem protéica como: os de clara de ovo – EWTI e de *Cratylia mollis* – CmTI. Esse inibidor foi isolado e estudado do feijão camaratu por Paiva (1998).

O PMSF liga-se covalentemente à serina do centro ativo, bloqueando a ação catalítica característica de uma serinoprotease (Barrett, 1994). A presença de um radical fenilalanina em sua estrutura, torna o TPCK um poente agente acilador, que age sobre a histidina 57 da quimiotripsina, inativando-a (Voet & Voet, 1996). Um mecanismo similar ocorre em TLCK, que possui um radical lisina, fato que o torna um potente inibidor de tripsina, pois essa molécula inibitória interage covalentemente com a histidina do sítio catalítico, de forma a bloquear a porção do centro ativo da enzima responsável pela ligação com o substrato (Pavlsko, et al. 1997). Benzamidina, um derivado amidina, apresenta uma forte inibição trípica, pois é conhecido na literatura que um autêntico sítio ativo de tripsina é inibido por guanidinas e amidinas; dessa forma, tal inibição comprova que a enzima em análise é uma típica tripsina (Mihalyi, 1978).

Pelas informações obtidas através do site na Internet da Biotimes – Novo ordisk (www.biotimes.com), as proteases compreendem as enzimas de maior relevância do ponto de vista industrial. Desde 1977, essa empresa comercializa enzimas industriais em larga escala. Haard (1992) cita diversas aplicações tecnológicas dessas enzimas como, por exemplo: em detergentes, medicamentos, processamento de couro e indústria de alimentos; onde as proteases são empregadas: no processamento de panificação, cerveja e vinho, leite e seus derivados, chocolate, ovos e

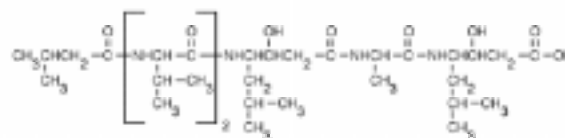


Figura 1. Estrutura química da Pepstatina A



Figura 2. Estrutura química de alguns inibidores de serino proteases

seus derivados, carnes e pescados, legumes, para produção de hidrolizados protéicos e molhos.

Produção e ativação de proteases em peixes

Em teleósteos, as proteases digestivas são amplamente encontradas em suas vísceras. O estômago, que secreta HCl, contém pepsina, uma protease que é produzida no epitélio sob a forma de pepsinogênio. Esse zimogênio é ativado por auto-catálise, liberando cerca de 40 a 50 resíduos de aminoácidos da sua região N-terminal (Kolodziejska & Sikorski, 1996).

Em mamíferos, as proteases digestivas do pâncreas são produzidas nas células acinar, sob forma de zimogênios, e são secretadas no lúmen do intestino, onde se encontra a enteroquinase (enteropeptidase), uma protease do intestino delgado, que catalisa a quebra de uma ligação peptídica específica no tripsinogênio, transformando-o em tripsina ativa. A partir de então, as moléculas de enteroquinase junto com as de tripsina (recém-ativadas) promovem um efeito cascata, que é responsável pela ativação de novos tripsinogênios e outros zimogênios como quimiotripsinogênio, procarboxipeptidase, proelastase, profosforilase (Brody, 1994). Em peixes, ocorre um processo similar (Kolodziejska & Sikorski, 1996), sendo que, na maioria deles, o pâncreas se encontra difuso em outros órgãos, como, por exemplo, os cecos pilóricos (Glass *et al.* 1989). Zenzian & Barnard (1967) sugerem que as proteases desse órgão nos peixes são do tipo pancreáticas.

Proteases de peixes

Existe uma alta diversidade em espécies no ambiente aquático, sobretudo

nas regiões tropicais, onde as condições climáticas favorecem o seu desenvolvimento. A subclasse Teleostei é composta de 50 ordens, incluindo cerca de 7.000 espécies de água doce e 13.000 de água salgada conhecidas até o momento. A Região Amazônica é considerada a mais rica em espécies de peixes da água doce no mundo. Entretanto, poucas tiveram seus aspectos biológicos estudados visando sua utilização pela aquicultura brasileira, entre elas está o tambaqui (Graef, 1995).

Desde 1940, proteases digestivas de alguns peixes foram estudadas. Uma pepsina de salmão foi a primeira protease de peixe a ser cristalizada (Norris & Elam, 1940). Apesar disso, poucas são estudadas em peixes de água doce, e essas proteases estudadas são de peixes que habitam as regiões temperadas, onde predominam baixas temperaturas (De Vecchi & Coppes, 1996). Existe uma enorme defasagem em informações sobre proteases de peixes dulciaquícolas de regiões tropicais e suas aplicações.

Peixes, como animais ectotérmicos, possivelmente apresentam adaptações em suas enzimas, de sorte que essas apresentam maior resistência a variações de temperaturas do que os animais homeotérmicos. Raa (1990) encontrou diferenças marcantes entre as proteases de peixes e de animais homeotérmicos. Esse autor estudou proteases em peixes de regiões temperadas e observou que essas enzimas apresentam altas atividades em baixas temperaturas. Fatos que, aliados a grande quantidade de vísceras disponíveis no mercado, tornam as proteases de teleósteos viáveis para processos industriais específicos, principalmente na indústria de alimentos e detergentes.

Tripsinas são isoladas a partir de diversos animais aquáticos. O pH ótimo de sua atividade fica geralmente entre os valores de 7,0 a 9,0, podendo chegar a 10. Ao contrário das tripsinas de mamíferos, é estável em meio alcalino. A temperatura ótima é em torno de 35°C a 60°C. A termoestabilidade, de um modo geral, é maior do que nos mamíferos. O peso molecular para animais aquáticos varia de 22,5 kDa a 31,4 kDa (Kolodziejska & Sikorski, 1996).

Tambaqui no contexto econômico

Tambaqui *Colossoma macropomum*

(Fig. 3), uma das espécies aquáticas de maior expressão na alimentação da Região Norte, apresenta ampla distribuição nos rios daquela região (Val & Almeida-Val, 1995). Esse peixe vem, nas últimas décadas, se tornando uma das principais espécies nativas para a aquicultura brasileira, apresentando um ótimo padrão de crescimento e de produtividade, fato que torna abundante a sua oferta no mercado consumidor.

Além da alta importância do tambaqui para a aquicultura brasileira, essa espécie conta também com um alto interesse junto aos piscicultores de outros países da América do Sul, devido à sua rusticidade, qualidade da carne e o fato de poder chegar a 1 m de comprimento total e a 30 kg de peso corporal no seu ambiente natural (Gouding & Carvalho, 1982). Suas características fazem do *C. macropomum* um candidato promissor ao desenvolvimento da piscicultura na América Latina (Saint-Paul, 1986). Há também registros de que o tambaqui está sendo testado em países de outros continentes (Araújo-Lima & Gouding, 1997).

Atividade proteolítica nos cecos pilóricos do tambaqui

Em nossos laboratórios, as proteases do tambaqui foram investigadas e, desse estudo, foram reunidos argumentos em favor de sua utilização em processos industriais. Adiante, são resumidos esses dados.

- Obtenção dos tecidos e preparação do extrato bruto dos cecos pilóricos

Após o exemplar do tambaqui ter sido sacrificado pelo frio, foi aberta uma janela à altura da linha lateral da região posterior à cabeça até a região inferior, entre o orifício urogenital e a nadadeira anal. Retirou-se o peritônio, e as vísceras foram afastadas para fora da cavidade do corpo. Essas etapas foram executadas rapidamente e mantidas em condições de baixa temperatura (4°C).

Os cecos pilóricos, localizados entre o estômago e o intestino, foram removidos e lavados internamente com o auxílio de uma seringa contendo solução salina (NaCl 0,9% p/v) a 4°C. Esses tecidos foram pesados, picotados e adicionados à solução salina e processados em homogeneizador elétrico, com rotação máxima, a uma temperatura de 4°C, na



Figura 3. Vista lateral de um exemplar do tambaqui (*Colossoma macropomum*, Cuvier, 1818)



Figura 4. Etapas da produção do extrato bruto dos cecos pilóricos do tambaqui (*C. macropomum*)

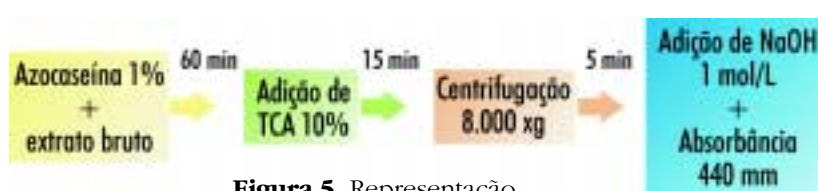


Figura 5. Representação esquemática da metodologia para determinação da atividade proteolítica alcalina em tampão Tris-HCl pH 7,2, utilizando azocaseína 1% como substrato (Leighton et al., 1973)

proporção de 2g para 25mL de solução. O homogeneizado foi centrifugado a 4°C durante 10 minutos a 13.000 x g, e o sobrenadante, denominado extrato bruto, transferido para recipientes de vidro, rotulados e acondicionados a -20°C até a realização das análises (Fig.4).

- Caracterização da atividade proteolítica no extrato bruto dos cecos pilóricos

Após a obtenção do extrato bruto dos cecos pilóricos, determinou-se a atividade proteolítica alcalina, conforme metodologia descrita por Leighton et al. (1973), representada na Fig. 5.

Dando seqüência, analisou-se a influência da temperatura e pH. As amostras foram processadas para determinação das atividades proteolíticas nas temperaturas que variaram de 10° a 85°C. A estabilidade térmica foi estabelecida por meio da incubação de alíquotas dos extratos brutos dos cecos pilóricos durante 30 min, a temperaturas que variaram de 25°C a 75°C. Após o equilíbrio da temperatura para 25°C, as atividades foram determinadas. O pH ótimo das enzimas foi estabelecido determinando-

se suas atividades em valores de pH que variaram de 7,2 a 9,0, usando-se soluções tampões Tris-HCl (Fig. 6)

- Purificação de uma tripsina termoes-tável dos cecos pilóricos

Procedimento simples, de baixo custo e eficiente foi implementado para purificar uma tripsina dos cecos pilóricos do tambaqui, o qual consistiu no seguinte: o extrato bruto foi submetido a 45°C durante 30 min e, em seguida, centrifugado a 13.000 x g durante 10 min, a 4°C. O sobrenadante foi fracionado com sulfato de amônio e a fração 40%-80 % coletada, porque nela ocorreu maior purificação e existia mais enzima. Essa fração foi então dialisada contra água deionizada e, em seguida, submetida a cromatografia em gel de filtração sephadex G75. A preparação coletada mostrou-se 50 vezes purificada e com um rendimento cerca de 40% em relação à quantidade inicial de atividade proteolítica. Essas etapas estão resumidas na Fig. 7.

Vale ressaltar que os estudos realizados com essa enzima parcialmente purificada mostraram tratar-se de uma tripsina termoresistente.

Existem fortes evidências de que as proteases dos teleosteos são adaptadas ao seu hábitat. A tripsina isolada do cecos pilóricos do tambaqui *Colossoma macropomum*, um peixe que habita a região tropical da América do Sul, apresentou um pH dentro da média encontrada na literatura (Bezerra et al. 2000, 2001a). Entretanto, a estabilidade térmica e o peso molecular ficaram acima dos descritos por Kolodziejska & Sikorski (1996) para teleosteos.

Segundo Bezerra et al. (2000), a atividade proteolítica nos extratos brutos do estômago e cecos pilóricos do tambaqui *C. macropomum* apresentaram valores de pH ótimo compatíveis com as de outras espécies descritas na literatura. A temperatura ótima da atividade proteolítica do extrato bruto do estômago foi similar às citadas na literatura, enquanto que para os cecos pilóricos, foi observado um valor superior.

Cerca de 2,7g de tripsina parcialmente purificada pode ser obtida no processamento de 1kg de cecos pilóricos do tambaqui (Bezerra et al. 2001a). Na Noruega, Gildberg (1992) reportou um processo de produção de proteases em alta escala, o qual produz expressivas quantidades de pepsinas e tripsinas a partir de vísceras de

peixes. Duas grandes empresas: KS Biotec-Mackzymal e Marine Biochemicals A/S, sediadas em Tromsø, são especializadas na produção de enzimas, entre elas proteases, a partir de vísceras e subprodutos da indústria pesqueira. Strøm & Raa (1993) citam alguns fatores que têm contribuído para o amplo desenvolvimento da Biotecnologia Marinha na Noruega, entre eles, podemos citar: presença de um setor industrial versátil na área; decisão governamental, ao longo dos anos 70, de aumentar o aproveitamento do pescado, utilizando e, conseqüentemente, reduzindo o desperdício; investimento maciço em pesquisas na área de Biotecnologia marinha pelas agências de fomento à pesquisa (NFFR e NFH); o desenvolvimento da Aquicultura nos anos 70, e, finalmente; o interesse geral de biotecnologistas na aplicação de princípios biotecnológicos no setor marinho.

Uma tecnologia foi desenvolvida por Bezerra et al. (2001b), visando à produção de hidrolisado protéico de peixe, através da ação enzimática de proteases do tambaqui. Essa tecnologia poderá contribuir para o desenvolvimento de melhores farinhas de peixe no mercado nacional.

Com o previsível e acentuado desenvolvimento da aqüicultura brasileira no início do século XXI e, conseqüentemente, o aumento na disponibilização de subprodutos, haverá a necessidade da utilização de conhecimentos obtidos através de pesquisas básicas para que através de um intercâmbio Universidade-empresa, seja possível o melhor aproveitamento desse material, o qual representa uma ótima fonte em potencial de moléculas bioativas, que deverá contribuir para o aumento da produtividade e, conseqüentemente, redução dos custos.

Dessa forma, devido à escassez brasileira de dados sobre proteases em peixes, faz-se necessário o incentivo aos estudos nessa área pelas instituições de fomento à pesquisa.

Referências

BARRETT, A. J., 1994. Classification of peptidases. *Methods in Enzymology*, New York, academic press. 244: 1-59.

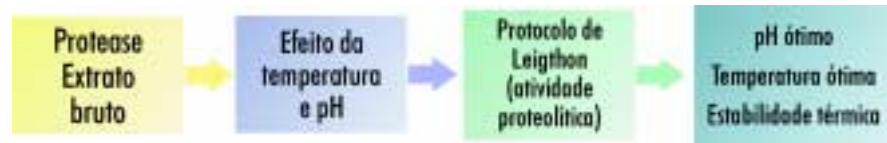


Figura 6. Representação esquemática da metodologia utilizada para a obtenção das propriedades físico-químicas das proteases alcalinas dos cecos pilóricos do tambaqui (*C. macropomum*) (Bezerra et al., 2000)

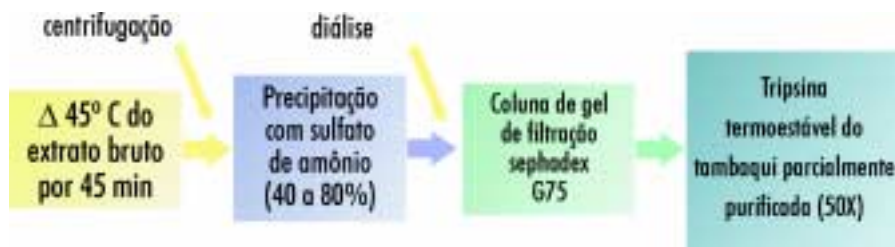


Figura 7. Representação esquemática da metodologia utilizada para a obtenção de uma tripsina termoestável nos cecos pilóricos do tambaqui (*C. macropomum*) (Bezerra et al., 2001)

BEZERRA, R. S.; DOS SANTOS, J. F.; LINO, M. A. S., VIEIRA, V. L. & CARVALHO JR, L. B., 2000. Characterization of stomach and pyloric caeca proteinases of tambaqui (*Colossoma macropomum*). *Journal of Food Biochemistry*, 24(3), 189-199.

BEZERRA, R. S., SANTOS, J. F., PAIVA, P. M. G., CORREIA, M. T. S., COELHO, L. C. B. B., VIEIRA, V. L. A. & CARVALHO JR, L. B., 2001a. Partial purification and characterization of a thermostable trypsin from pyloric caeca of tambaqui (*Colossoma macropomum*). *Journal of food Biochemistry*, 25(3) (in press).

BEZERRA, R. S., SILVA, J. B., COELHO, L. C. B. B., VIEIRA, V. L. A. & CARVALHO JR, L. B. 2001b. Hydrolysis of tilapia muscle proteins by alkaline protease from tambaqui (*Colossoma macropomum*) pyloric caeca. *Journal of Food Biochemistry*, (submitted).

BRODY, T., 1994. *Nutritional Biochemistry*. Academic Press, printed in the USA, 657p.

DE VECCHI, S & COPPES, Z., 1996. Marine fish digestive proteases – relevance to food industry and the southwest Atlantic region – a review. *J. Food Biochem*, 20: 193-214.

GILDBERG, A., 1992. Recovery of

proteinasas and protein hydrolysates from fish viscera. *Bioresource technology*, 39: 271-276.

GLASS H. J. McDONALD N. L. MORÁN R. M. & STARK J. R., 1989. Digestion of protein in different marine species. *Comparative Biochemistry and Physiology*, 94(B): 607-611.

HAARD, N. F., 1992. A review of proteolytic enzymes from marine organisms and their application in the food industry. *J. Aq. Food. Product Tech.* 1(1): 17-35.

KOŁODZIEJSKA, I. & SIKORSKI, Z. E., 1996. The digestive proteases of marine fish and invertebrates. *Bull. Sea Fish Inst.*

137(1), 51-56.

MIHALYI, E., 1978. In *Application of proteolytic enzymes to protein structure studies*. 2nd Ed Vol. 1, CRC Press, Boca Raton, FL.

NORRIS, E. R. & ELAM, D. W., 1940. Preparation and properties of crystalline salmon pepsin. *Journal of Biological Chemistry*. 134, 443-454.

PAIVA, P. M. G. 1998. Caracterização de proteases, inibidores de proteases e de uma proteína de reserva (cratilina) de sementes de *Cratylia mollis*. Ph.D. thesis. Universidade federal de São Paulo – Escola Paulista de Medicina. São Paulo – Brazil.

PAVLISKO, A., RIAL, A. DE VECCHI, S. AND COPPES, Z. 1997a. Properties of pepsin and trypsin isolated from the digestive tract of *Parona signata* “palometa”. *Journal of Food Biochemistry*, 21:289-308.

RAA, J., 1990. Biotechnology in aquaculture and the fish processing industry: a success story in Norway. In *Advances in Fisheries Technology and Biotechnology for Increased Profitable*; VOIGT, M.N., BOTTA, J. R., (Technomic Publishing Lancaster) pp. 509-524.

STRØM, T. & RAA, J., Marine biotechnology in Norway. *Journal of Marine Biotechnology*, 1: 3-7.

VOET, D. & VOET, J. G., 1996. *Biochemistry*. John Wiley & Sons, printed in the USA. 1223p, 2^a ed.

ZENDZIAN E. N. & BARNARD E. A., 1967. Distribution of pancreatic ribonuclease, chymotrypsin and trypsin in vertebrates. *Archives Biochemistry and Biophysics*, 122: 699-713.