

2.08.01 - Bioquímica / Química de Macromoléculas.

PURIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE DIFERENTES ISOFORMAS DE TRIPSINA A PARTIR DO INTESTINO DA CAVALA (*Scomber scombrus*), ATRAVÉS DE FRACIONAMENTO COMPARATIVO COM DIFERENTES SOLVENTES ORGÂNICOS.

Cláudio W. V. Santos^{1*}, Dávida M. R. V dos Santos¹, Cledson. B. de Souza¹, Tatiele P. Silva¹, Humberto de A. Tenório¹, Maria E. da C. Marques¹, Monizy da C. Silva², Roberta R. F. dos Santos², Fabiana S. Albuquerque³, Hugo J. V. Pereira⁴

1. Aluno de Doutorado do Instituto de Química e Biotecnologia, da Universidade Federal de Alagoas UFAL
2. Aluno de Mestrado (IQB-UFAL)
3. Aluno de IC (IQB-UFAL)
4. Professor pesquisador/ Orientador (IQB-UFAL)

Resumo:

Embora exista uma real demanda em todo o mundo para o aumento no consumo de peixes, a sua comercialização ainda está muito fortemente atrelada a exportação da carne, sendo que as vísceras, por si só, representa 30% do peso bruto do animal, e que além disso, é uma fonte rica de enzimas de elevado valor biotecnológico (FAO-SOFIA, 2004 *apud* KHALED et al, 2011). Assim, acredita-se que estudos destinados a purificação e caracterização de enzimas extraídas a partir dos subprodutos da atividade pesqueira se mostra de grande importância, tendo em vista a possibilidade de descentralizar a fonte de renda, empregar todo o conteúdo em massa do animal a fins lucrativos, e ao mesmo tempo, dispor no mercado, moléculas hidrolíticas com características bioquímicas mais atrativas, quando comparadas com as que já são comercializadas.

Para a purificação da enzima do intestino do peixe *Scomber scombrus* (cavala) serão feitos extratos com o intestino do animal. O extrato bruto será homogeneizado, em um homogeneizador de tecidos em solução tampão. Após o preparo do extrato, será efetuada uma separação de frações proteicas por diferentes solventes orgânicos (acetone e etanol).

O objetivo desse trabalho é purificar e caracterizar diferentes isoformas de tripsina a partir do intestino do *Scomber scombrus* (peixe cavala) utilizando diferentes solventes orgânicos como etapa de precipitação de proteínas.

Autorização legal: 08/2018

Palavras-chave: Acetona; Etanol; Economia pesqueira.

Apoio financeiro: CAPES.

Trabalho selecionado para a JNIC pela instituição: UFAL

Introdução:

O setor agropecuário participa na atualidade como o principal fornecedor de produtos alimentícios, sob a responsabilidade de distribuir no mercado econômico produtos consumidos de forma direta, sem prévio processamento industrial, mas também aqueles classificados como industrializados. Sob perspectivas gerais, por trás de toda a rede econômica envolvida nas transações de importação e exportação dos produtos, há uma preocupação quanto à qualidade e confiabilidade dos diferentes alimentos comercializados, assim como, se houver um aumento populacional, se este setor conseguirá suprir e manter a demanda alimentar de forma a garantir a qualidade dos mesmos.

De acordo com Roppa (2009), o consumo de carne tem uma forte correlação com o PIB *per capita*, ao passo que se eleva o poder aquisitivo, aumenta-se também o consumo de carnes, e em decorrência, a sua produção. Através de estudos realizados por Sidônio e colaboradores (2012), observou-se que em escala mundial, o consumo de proteína animal é muito associado a comercialização de produtos oriundos da pesca, principalmente aqueles obtidos da extração direta, ou seja, os que não são produzidos em cativeiro. Tal efeito, pode ser atribuído a boa qualidade nutricional do produto, assim como o baixo custo de produção, quando o comparamos com as demais atividades agrícolas voltadas a comercialização de proteína animal, uma vez que são dependentes de fatores geoclimáticos.

Assim como qualquer espécie de seres vivos, os peixes necessitam de nutrientes básicos, os quais fomentem energia e metabólitos essenciais às vias catabólicas e anabólicas. A capacidade digestiva pode ser definida como a habilidade do animal em secretar enzimas no trato digestivo, a fim de hidrolisar as macromoléculas presentes nos alimentos até suas respectivas unidades monoméricas. Os nutrientes dos alimentos, antes de serem absorvidos, devem passar por processos de digestão e absorção, e estes, por sua vez, dependerão da disponibilidade de enzimas, como a tripsina, quimotripsina e pepsinogênio, as quais podem ser encontradas em locais específicos ao longo do trato gastrointestinal (CHONG et al., 2002; JUN-SHENG et al., 2006; KUMAR et al., 2007).

Estas moléculas, também classificadas como hidrolases, são responsáveis pela catálise de diferentes

proteínas e peptídeos, agindo em regiões específicas da cadeia polipeptídica. Tal característica faz das proteases uma classe de enzimas bastante utilizadas em inúmeros processos biotecnológicos, que vão desde a sua utilização na alimentação animal, como aditivos em rações, à produção de fármacos, e incrementos na produção de detergentes e seus derivados.

Embora exista uma real demanda em todo o mundo para o aumento no consumo de carnes, a sua comercialização ainda está muito fortemente atrelada a exportação da carne, sendo que as vísceras, por si só, representa 30% do peso bruto do animal, e que além disso, é uma fonte rica de enzimas de elevado valor biotecnológico (FAO-SOFIA, 2004 *apud* KHALED et al, 2011).. Assim, acredita-se que estudos destinados a purificação e caracterização de enzimas extraídas a partir dos subprodutos da atividade pesqueira se mostram de grande importância, tendo em vista a possibilidade de descentralizar a fonte de renda, empregar todo o conteúdo em massa do animal a fins lucrativos, e ao mesmo tempo, dispor no mercado, moléculas hidrolíticas com características bioquímicas mais atrativas, quando comparadas com as que já são comercializadas.

Como exemplo destes estudos, destaca-se neste trabalho a purificação e caracterização de diferentes tripsinas, a partir do intestino do peixe cavala (*Scomber scombrus*), animal marinho, da espécie de peixes pelágicos pensiformes, pertencente à família *Scomberidae*. Seu hábito alimentar é carnívoro, e pode ser encontrado em maior abundância ao longo das costas do nordeste da Europa (<http://www.fishbase.org/summary/118>). Sua carne saborosa o torna um animal muito apreciado pela gastronomia internacional, sendo por isso comercializado em diferentes regiões do mundo.

O objetivo desse trabalho é purificar e caracterizar diferentes isoformas de tripsina a partir do intestino do *Scomber scombrus* (peixe cavala) utilizando diferentes solventes orgânicos como etapa de precipitação de proteínas

Metodologia:

Os animais foram obtidos por pescadores artesanais da cidade de Maceió (Alagoas) em que nos foi disponibilizado exclusivamente as vísceras, retiradas pelos próprios pescadores. Após extração, o material foi imediatamente colocado em sacos plásticos lacrados e armazenados em recipiente com gelo, à 4°C, para evitar que as enzimas sofressem processo de desnaturação.

Após coleta dos materiais cedidos pelos pescadores, foi realizado no Laboratório de Metabolismo e Proteômica (LAMP) da Universidade Federal de Alagoas (UFAL) a preparação do extrato bruto de diferentes regiões do trato gastrointestinal do *Scomber scombrus*, na finalidade de identificar o órgão de maior atividade tripsínica. Para isso foi utilizado como aparato uma tesoura, e um almofariz, para maior trituração dos tecidos. Posteriormente, foi realizado um ensaio enzimático para cada extrato obtido, tomando como substrato o N-*benzoyl-L-arginine-p-nitroanilide* (BAPNA). Para certificação da atividade, realizou-se a medição espectrofotométrica a 410 nm, referente ao produto de hidrólise *p-nitroanilina*. Ambos os extratos foram preparados em tampão Tris HCl 50 mM pH 8,0, e todos os procedimentos realizados à de 4°C.

Após identificação da região de maior concentração enzimática (tripsina) efetuamos um fracionamento com diferentes solventes orgânicos, acetona e etanol, variando a proporção, v/v, de 0-80% dos respectivos solventes. Para isso tomou-se a precaução de a adição ser gradativa, sob baixa agitação, e a temperatura em 4°C. posteriormente, avaliou-se a atividade tripsínica para ambas as metodologias, e as frações que expressaram maiores atividades foram dialisadas e concentradas com polietileno glicol, para posterior cromatografia líquida.

As frações com maiores atividades de hidrólise perante o substrato BAPNA foram submetidas a uma coluna cromatográfica S-100 Sephacril, gel-filtração (50 mL), acoplada a um FPLC AKTA M1. A coluna foi previamente equilibrada com Tris HCl 50 mM pH 8,0 + 0,5 M de NaCl, e a cromatografia foi realizada sob um fluxo de 0,1 mL/min, o volume coletado foi de 2,0 mL para cada uma das frações obtidas. Durante o experimento, avaliou-se em tempo real o perfil de eluição das proteínas, através do monitoramento a 280 nm.

As eletroforeses foram realizadas a voltagem constante, em gel de poliacrilamida com dodecil-sulfato de sódio (SDS-PAGE) 12 e 15%, usando 5% e 15% (m/v) para os géis de empilhamento e separação respectivamente (LAEMMLI, 1970). Ao fim, o gel foi mergulhado em 0.2% Coomassie Brilliant Blue G-250 em H₂O: Metanol (1:1), e posteriormente lavado com solução descolorante (50% metanol e 10% ácido acético). Para a determinação da massa molecular das proteínas, assim como a identificação das estruturas primárias, foram recortadas as bandas referentes às enzimas purificadas e encaminhadas para análise de espectrometria de massas, no modo MS/MS.

A concentração da proteína foi determinada pelo método de Bradford (1976), usando albumina de soro Bovino como padrão (250-0,009 µg/mL). Para isso foram tomados 10 µL das amostras, adicionados 190 µL de reagente de Bradford. Posteriormente as amostras foram incubadas por 5 min, e medido a absorvância a 595 nm. As unidades correspondentes são (mg/mL) de proteína.

Para a determinação do pH ótimo, foi avaliado o tamponamento com maior taxa de hidrólise do substrato BAPNA, os sistemas tampão escolhidos foram: acetato de sódio (pH 4-6); fosfato de sódio (pH 7,0); Tris-HCl (pH 8,0); glicina (pH 9-11) todos à concentração de 100 mM. Para determinação do pH ótimo, as enzimas foram mantidas a 37°C nos diferentes pHs por 60 min, e posteriormente determinado a taxa da hidrólise, usando o BAPNA como substrato, e o monitoramento a 410 nm. Em se tratando dos testes de estabilidade, a proteína isolada foi incubada por 60 min nos diferentes pHs, a temperatura de 50 °C (temperatura ótima). Após o tempo especificado, todas as frações foram submetidas a reação com o BAPNA, e assim avaliado, por meio da intensidade da leitura (410 nm) a estabilidade dependente da variação de pH.

As enzimas isoladas tiveram suas atividades avaliadas em diferentes temperaturas, 20–70 °C, para especificar a temperatura ótima. A determinação da temperatura ótima foi realizada através da incubação das

enzimas por 60 min nas diferentes temperaturas, e posteriormente, avaliado a taxa de hidrólise do substrato BApNA. Para os testes de estabilidade, a proteína isolada foi incubada por 60 min nas diferentes temperaturas 20-70 °C, e posteriormente, submetida a hidrólise com o substrato por mais 60 min, e assim avaliado a liberação do p-nitroanilina num espectrofotômetro a 410 nm.

A ação catalítica das enzimas purificadas a partir do intestino da Cavala foi avaliada na presença de diferentes inibidores: Fluoreto de Fenilmetilsulfonil (PMSF) (1mM), 2-Mercaptoethanol (1mM) e Ácido Etilenodiaminotetracético (EDTA) (1mM) e Benzamidina (1mM). Nesta análise, a enzima foi incubada com os inibidores por 60 min a 25°C, procedendo o teste de atividade como descrito anteriormente. A reação sem a presença de inibidores foi tomada como 100% de atividade.

Os estudos cinéticos das enzimas Purificadas foram efetuados durante 60 min a 50°C em diferentes concentrações do substrato BApNA (0 a 4,0 mM). As determinações foram tomadas de acordo com os parâmetros cinéticos, incluindo Km e Vmax. O kcat foi calculado pela seguinte equação: $kcat = Vmax/[E]$, onde [E] é a concentração de enzima total e Vmax a sua velocidade máxima

Resultados e Discussão:

Ao comparar os extratos preparados para as diferentes regiões do trato gastrointestinal do animal (*Scomber scombrus*), verificou-se que o intestino possuía a maior atividade detectada. Sendo então esse o órgão escolhido para as demais análises. As precipitações realizadas, para ambos os solventes escolhidos mostrou que a tripsina havia sido concentrada numa única fração, no sobrenadante final, e com valores de recuperação bastante aproximado, em que na metodologia realizada com etanol obteve-se um rendimento de 32,35%, ao passo que com acetona, foi de 35%.

Após o fracionamento, as enzimas foram purificadas em um único processo cromatográfico, e com recuperações estimadas em 26,32% para a metodologia usando etanol (FE) na etapa de precipitação, e de 62,4% para enzima precipitada com acetona (FA). Observe que a recuperação da segunda análise FA mostrou resultados de recuperação bem mais elevado que o desempenhado com etanol. Tal explicação pode estar associada a incidência de mais de uma isoforma presente no cromatograma obtido para FE.

A validação do método de purificação e a determinação do peso molecular foi estimada através da eletroforese em gel de poliacrilamida SDS-PAGE, onde foi possível estimar a massa aproximada para ambas as proteínas em 24 KDa. **Figura 1.**

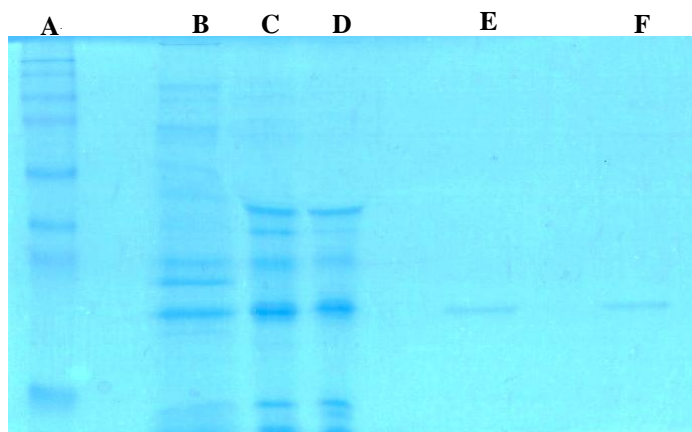


Figura 1. SDS-PAGE da tripsina purificada a partir do intestino do (*Scomber scombrus*). Coluna **A**: Padrão de massa; coluna **B**: Extrato bruto; coluna **C**: fração de precipitação com etanol, coluna **D**: fração de precipitação com acetona; coluna **E**: tripsina purificada de FE e coluna **F**: tripsina purificada de FA. A eletroforese foi processada a voltagem constante (90 mV).

Os testes de pH e temperatura ótimos mostraram que ambas as enzimas apresentaram estabilidades em pH 8,0 e 50°C. Além disso, as proteínas tiveram o mesmo perfil de estabilidade, após 60 min de incubação nas diferentes condições testadas. A maior estabilidade foi mantida em valores de pH alcalinos 8,0-11,0, e a temperaturas abaixo de 40°C.

O ensaio inibitório confirmou ser uma enzima tipo tripsina, com elevada sensibilidade aos inibidores clássicos das serino proteases. **Figura 2.**

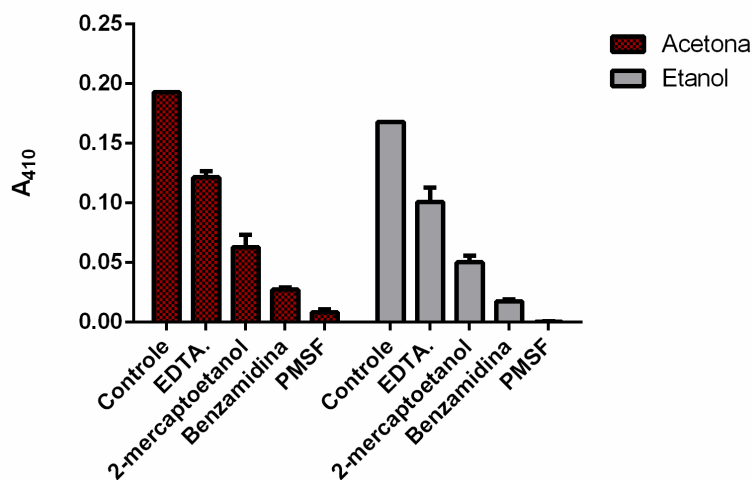


Figura 2. Teste de Inibição: As enzimas purificadas foram encubadas por 60 min a 25°C com diferentes inibidores: PMSF (1 mM); EDTA (1 mM) e 2-Mercaptoetanol (1 mM) e Benzamidina (1mM). A atividade remanescente foi avaliada em pH 8,0 a 50°C por 7 h. A atividade da enzima medida sem a presença do inibidor foi tomada como 100%.

Embora as análises apresentadas mostrarem elevada similaridade para ambas as moléculas, os estudos cinéticos de K_m e V_{max} , confirmaram que as moléculas são enzimas diferentes, tendo em vista que os valores obtidos neste ensaio para cada uma das proteínas foram extremamente diversificados.

Conclusões:

Com o estudo proposto foi possível purificar e caracterizar as tripsinas termoestáveis a partir do intestino do *Scomber scombrus* com apenas dois processos de purificação. As enzimas purificadas mostraram altas atividades ente pHs 6,0-11,0, bem como entre 20-40 °C. E com relação aos estudos bioquímicos realizados, verificou-se que ambas são pertencentes à família das serinoproteases.

Referências bibliográficas

ROPPA, L. **Perspectivas da produção mundial de carnes, 2007 a 2015.** Disponível em: <http://pt.engormix.com/member_login.aspx?referer=yes> Acesso em: janeiro de 2015. 2009.
SIDONIO, L. et al. **Panorama da aquicultura no Brasil: desafios e oportunidades.** BNDES Setorial, v. 35, p. 421-463, 2012.

CHONG; et al. Partial characterization and activities of proteases from the digestive tract of discus fish (*symphysodn aequifasciata*). **Aquaculture**, v. 203, p. 321-333. 2002.

JUN- SHENG; et al. Otogeny of protease, amylase and lipase in the alimentary tract of hibrid juvenile tilapia (*Oreochromis niloticus X Oreochromis aureus*). **Physiol Biochem**, V. 32, p. 295-303, 2006.

KUMAR, S; et al. Digestive proteases of three carps *catla catla*, *Labeo rohita* and *hypophthalmichthys moletrix*: partial characterization and protein hidrolisis efficiency. **Aquaculture nutrition**, v. 13, p. 381-388, 2007.

FAO-SOFIA. The state of world fisheries and aquaculture (SOFIA) 2004. FAO Fisheries Department, Rome tuna (*Thunnus albacores*) spleen: purification and characterization. **Comp Biochem Physiol**, 144B:47-56. 2004.

Scomber scombrus Linnaeus, 1758 Atlantic mackerel. Disponível em<<http://www.fishbase.org/summary/118>> acesso em 22 de julho de 2017