

CARACTERIZAÇÃO PARCIAL À ÍONS METÁLICOS DE UMA PROTEASE COM PROPRIEDADES COLAGENOLÍTICAS EXTRAÍDA DE VÍSCERAS DIGESTIVAS DE PESCADA-BRANCA (*Cynoscion leiarchus*)

Vagne de Melo Oliveira^{1*}; Nathalia Albuquerque Roberto²; Luiz Henrique Svintiskas Lino³; Ranilson de Souza Bezerra⁴; Ana Lucia Figueiredo Porto⁵

¹Doutor em Ciências Biológicas, Universidade Federal de Pernambuco; ²Bacharelada em Ciências Biológicas, Universidade Federal de Pernambuco; ³Bacharelado em Ciências Biológicas, Faculdade Frassinetti do Recife (FAFIRE); ⁴Professor Doutor em Ciências Biológicas, Universidade Federal de Pernambuco; ⁵Professora Doutora em Engenharia Química, Universidade Federal Rural de Pernambuco. *Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal, Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife/PE. e-mail:vagne_melo@hotmail.com

RESUMO

A pescada-branca (*Cynoscion leiarchus*) é uma espécie de peixe com hábitos carnívoros, distribuída ao longo da costa nordestina, apresentando grande importância comercial. Este trabalho objetivou caracterizar parcialmente quanto a sensibilidade aos íons metálicos (Cu^{2+} , K^+ , Zn^{2+} e Pb^{2+}) uma protease com propriedades colagenolíticas de *C. leiarchus*, em três diferentes molaridades (1, 5 e 10 mM). Para tanto, foram utilizados 500g de vísceras intestinais de *C. leiarchus* obtidas através de colônia de pescadores em Ponta Verde, Maceió-AL, Brasil. A etapa de extração enzimática foi realizada através do processo de maceração e homogeneização. A etapa de sensibilidade foi realizada por exposição direta aos íons metálicos. Os resultados indicaram que os íons em suas respectivas molaridades, apresentaram diferentes graus de redução da atividade enzimática, no entanto, o íon de Pb^{2+} , na concentração de 10 mM, inativou por completo a enzima. Os resultados apresentados sugerem sensibilidade da protease colagenolítica aos íons testados, informação que pode servir de base para futuras aplicações industriais.

Palavras-chave: colagenolítica, proteases, resíduos digestivos.

PARTIAL CHARACTERIZATION TO METAL IONS OF A PROTEASE WITH COLLAGENOLYTIC PROPERTIES EXTRACTED GUTS DIGESTIVE FROM HAKE (*Cynoscion leiarchus*)

ABSTRACT

The hake is a carnivorous species of fish, distributed along the northeastern coast, with great commercial importance. This study aimed characterize partly, the sensibility a protease with collagenolytic properties of *C. leiarchus* sensitivity to metal ions (Cu^{2+} , K^+ , Zn^{2+} e Pb^{2+}) in three different molarities (1, 5 and 10 mM). For this, we used 500g of intestinal viscera of *C. leiarchus* obtained through fishing colony in Ponta Verde, Maceió-AL, Brazil. The process of enzyme extraction was performed by maceration and homogenization. The sensitivity step was performed by direct exposure to metal ions. The results indicated that the ions in their respective molarities, showed different degrees of reduction of enzymatic activity. However, the enzyme was completely inactivated by the Pb^{2+} in a concentration of 10 mM. The results suggest that the sensitivity of the collagenolytic protease tested ions, information that can serve as a basis for future industrial applications.

Keywords: Collagenolytic, proteases, digestive waste.

INTRODUÇÃO

As proteases colagenolíticas são enzimas com aplicabilidade em diversos setores industriais como o alimentício, onde são utilizadas principalmente em procedimentos como amaciamento dos alimentos, nas indústrias farmacológicas no desenvolvimento de agentes para o tratamento da osteoporose, ulceração gástrica, hipertensão, isolamento e cultivo de células; nos procedimentos medicinais, principalmente nos tratamentos de queimaduras, úlceras, cicatrizes pós-operatórias e hipertróficas, e também no desenvolvimento de cosméticos (1-2). Essas enzimas são capazes de hidrolisar as ligações peptídicas do colágeno e estão classificadas em 2 grandes grupos: serinocolagenases e as metalocolagenases. As serinocolagenases são caracterizadas pela presença de um grupo de serina em seu sítio ativo e estão envolvidas em processos biológicos como: digestão dos alimentos, produção de hormônios, digestão de proteínas, na fibrinólise e coagulação, enquanto que as metalocolagenases são endopeptidases que dependem de uma forte ligação Zn^{2+} para apresentarem suas atividades catalíticas e são capazes de degradar vários tipos de colágenos (1). As colagenases têm sido isoladas e caracterizadas a partir de células microbianas (3-5), tecidos animais (6 – 9) e também vegetais (2).

Os resíduos gerados pelo processamento do pescado representam uma rica fonte dessas proteases, inclusive as com propriedades colagenolíticas(8). Contabilizando cerca de 70% do peso total do peixe, esses resíduos incluem materiais como vísceras digestivas, ossos, pele, escamas, nadadeiras e cabeças, (10) e devido ao oneroso custo para manutenção de todo processamento, esses materiais são frequentemente descartados e despejados sem o menor tratamento no meio ambiente, contribuindo para a ocorrência de danos ambientais e problemas de saúde pública (11). Em virtude disso, a comunidade científica têm se voltado a pesquisas que visam a recuperação e utilização desses resíduos, como fonte alternativa de ganhos, através da agregação de valor, como por exemplo, a exploração das biomoléculas presentes nestas vísceras. A viabilidade do uso de proteases colagenolíticas extraídas a partir de resíduos do pescado já foi evidenciada em diversas espécies que possuem um importante papel na indústria pesqueira mundial, como *Scomber japonicus* (12), *Novoden modestrus* (13), *Salmo salar* (14), *Sardinella aurita* (15) e de *Gadus morhua* (16).

No Brasil, a indústria pesqueira tem apresentado um crescimento constante, principalmente nos últimos 10 anos. Em 2011 a produção atingiu cerca de 1,43 milhões de toneladas (t), 13,2% a mais do que no ano anterior (17). Entre os períodos de 2003

à 2012, a produção de pescado no Brasil cresceu 16.9%, com patamar de 266.042 milhões t em 2012, valor que inseriu o Brasil na 10ª posição do ranking mundial da produção de pescado (18). Dentre as espécies que apresentam relevância na produção do pescado no país temos a pescada-branca (*C. leiarchus*), uma espécie de peixe marinho que apresenta ampla distribuição pelo litoral do Nordeste brasileiro, sendo muito apreciada pela população. Assim, com este trabalho, objetivou-se caracterizar parcialmente quanto a íons metálicos uma protease com propriedades colagenolíticas a partir de resíduos do processamento de *C. leiarchus*.

MATERIAIS E MÉTODOS

Para realização dos experimentos foram utilizados 500g de vísceras intestinais de *C. leiarchus* cedidas (Figura 1), gentilmente, pela colônia de pescadores de Ponta Verde, Maceió, Alagoas, Brasil. O material foi imediatamente congelado e conduzido ao Laboratório de Enzimologia, Departamento de Bioquímica, Centro de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Pernambuco (CCB/UFPE), onde foram armazenadas em freezer (-80°C) para processamentos subsequentes.

Etapa de extração

O processamento do material destinado para análises das propriedades colagenolíticas foi realizado de acordo com a metodologia descrita por Teruel e Simpson (19) com modificações. A proporção de vísceras para o tampão de extração (Tris 0,05 M-HCl a pH 7,4, contendo 5mM de CaCl₂) foi de 1:5(p/v). As vísceras intestinais foram homogeneizadas durante 5 minutos com o homogeneizador no ajuste de velocidade de 10.000-12.000rpm(4°C). O material homogeneizado foi centrifugado (Centrífuga Sorvall Superspeed RC-6, Carolina do Norte, EUA) a 12.000 g durante 30 min a 4°C. O sobrenadante final (extrato bruto) foi armazenado a -25°C.



Figura 1: Exemplo de pescada-branca capturada por pescadores da colônia de Ponta Verdade, Maceió, Alagoas, Brasil. Fonte: acervo pessoal.

Etapa de atividade enzimática

As propriedades colagenolíticas do extrato bruto foram determinadas de acordo com a metodologia modificada por Adigüzelet al. (20) utilizando azocoll como substrato. Para a reação, 5mg de azocoll (substrato específico, SIGMA A4341) foram misturados a 500µl de tampão Tris-HCl 50mM (pH 7,5) contendo 5 mM de CaCl₂ e 500 mL do extrato bruto. Essa mistura foi incubada a 55°C durante 30 minutos, sob agitação. Posteriormente foi adicionado 200µl de ácido tricloroacético (TCA) e a mistura foi incubada por mais 10 minutos. Por fim, as amostras foram centrifugadas a 10.000 g durante 10 minutos (4°C), e a leitura feita a um comprimento de onda de 595nm. Uma unidade de enzima foi definida como a quantidade de enzima necessária para aumentar a absorbância de 0,01 a 595 nm.

Etapa de sensibilidade enzimática

Para o ensaio de sensibilidade, foram utilizados 4 íons, a saber: cobre (Cu⁺), chumbo (Pb²⁺), zinco (Zn²⁺) e potássio (K⁺), em três diferentes concentrações molares (1, 5 e 10 mM). O teste de sensibilidade foi determinado incubando-se 250µL de extrato enzimático (E.B) com 250µL de cada íon metálico em suas diferentes concentrações molares durante 30 minutos a 27°C e, em seguida, acrescentou-se a reação com 1000 µL de tampão Tris-HCl 50mM (pH 7,5 contendo 5 mM de CaCl₂) e 5 mg de azocoll. Após o período de incubação de 30 min. a 55°C sob agitação constante, a leitura das absorbâncias foi realizada em leitor de microplaca (xMark™ BIORAD) no comprimento de onda de 595 nm. A atividade da enzima na ausência de quaisquer aditivos (íons) foi considerada como 100%. Todas as análises foram realizadas em triplicata (20-21).

Análise estatística

Os valores médios para os diferentes tratamentos foram comparados utilizando análise de variância com um fator (One-way ANOVA) seguida pelo teste de Tukey. O nível de significância adotado foi de 95% ($p < 0.05$), usando o software de modelagem MicroCal Origin Versão 8.0 (Microcal, Northampton, MA, EUA).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

De acordo com os resultados obtidos, todos os íons testados foram capazes de reduzir a atividade da protease colagenolítica. Para o íon de Cu^+ , a menor atividade observada foi na concentração 10 mM com 15.30 ± 0.00 . Nas concentrações de 1 e 5mM as inibições foram de 64.49 ± 0.01 e de 33.06 ± 0.02 , respectivamente. Quando exposta ao íon de Pb^{2+} , a enzima apresentou uma atividade de 60.58 ± 0.02 na concentração de 1 mM e de 34.88 ± 0.20 na de 5 mM. Na concentração de 10 mM, o Pb^{2+} inativou a atividade enzimática.

As análises também indicaram uma redução da atividade enzimática quando exposta ao íon de Zn^{2+} , sendo os valores obtidos de 93.19 ± 0.03 , 52.37 ± 0.02 e 40.01 ± 0.00 para as concentrações de 1, 5 e de 10 mM, respectivamente. Quando exposta ao íon de K^+ , a atividade da enzima foi reduzida, apresentando os seguintes resultados 88.15 ± 0.02 , 44.60 ± 0.02 e 42.67 ± 0.02 para as concentrações de 1, 5 e 10 mM, respectivamente.

Os resultados encontrados por Kim et al. (13) em ensaios de sensibilidade de uma protease com atividades colagenolíticas a partir de resíduos intestinais de *Novoden modestrus* aos íons metálicos na concentração 0,06 mM mostraram maior redução da atividade quando exposta a Cu^{2+} e ao Zn^{2+} , enquanto o Pb^{2+} promoveu um aumento. Experimentos semelhantes realizados com a espécie de peixe *Scomber japonicus* (12) também mostraram que a enzima desta espécie é extremamente sensível à Cu^{2+} , Zn^{2+} e Pb^{2+} (1mM). Na concentração de 1 mM, os resultados obtidos para todos os íons na diferiram significativamente do controle (100%), com exceção apenas do íon de K^+ . Nas concentrações de 5 e 10 mM, todos os íons apresentaram diferença significativa em relação ao controle.

Os íons metálicos podem atuar nas reações enzimáticas como cofatores ou inibidores interferindo de diversas maneiras. A sensibilidade da enzima a esses íons é determinada de acordo com suas propriedades bioquímicas pode ser influenciada por fatores como tipo de íon metálico ao qual está exposta e sua concentração (22). Assim, os dados obtidos para uma espécie ou classe de enzimas não significam,

necessariamente, que esses resultados sejam padronizados, pois o tipo de interação entre essas moléculas pode variar.

CONCLUSÕES

Os resultados apresentados sugerem sensibilidade da protease com propriedades colagenolíticas aos íons testados, informação valiosa para se tomar por base futuras aplicações industriais.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Lima CA. Produção, caracterização e purificação da colagenase do *Penicillium aurantiogriseum* URM-4622, visando sua aplicação na produção de peptídeos do colágeno. [Tese]. Recife: Centro de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Pernambuco; 2012.
2. Raskovic B, Bozovic O, Prodanovic R, Niketic V, Polovic N. Identification, purification and characterization of a novel collagenolytic serine protease from fig (*Ficus carica* L. Brown Turkey) latex. J. Biosci. Bioeng, 2014.
3. Wu Q, Li C, Li C, Chen H, Shuliang L. Purification and Characterization of a Novel Collagenase from *Bacillus pumilus* Col-J. Appl. Biochem. Biotechnol. 2010; 160:129–9.
4. Watanabe K. Collagenolytic proteases from bacteria. Appl. Microbiol. Biotechnol. 2004; 63: 520–6.
5. Lima LA, Cruz Filho RF, Santos JG, Silva WC. Produção de protease colagenolítica por *Bacillus stearothermophilus* de solo amazônico. Acta Amaz. 2014; 44(4) : 403-10.
6. Sivakumar P, Sampath P, Chandrakasan G. Collagenolytic metalloprotease (gelatinase) from the hepatopancreas of the marine crab, *Scylla serrata*. Comp. Biochem. Physiol. B. 1999; 123: 273 –9
7. Hernández-Herrero M, Duflos G, Malle P, Bouquelet S. Collagenase activity and protein hydrolysis as related to spoilage of iced cod (*Gadus morhua*) Food Res. Int. 2003; 36: 141– 7.
8. Daboor SM, Budge SM, Ghaly AE, Brooks MS, Dave D. Isolation and activation of collagenase from fish processing waste. Adv. Biosci. Biotechnol. 2012; 3:191-203
9. Sriket C, Benjakul S, Visessanguan W, Kishimura H. Collagenolytic serine protease in fresh water prawn (*Macrobrachium rosenbergii*): Characteristics and its impact on muscle during iced storage. Food Chem. 2011; 124: 29–35.
10. Klomklao S. Digestive proteinases from marine organisms and their applications. Songklanakarin J. Sci. Technol. 2008;30:37-46
11. Bougatef A. Trypsins from fish processing waste: characteristics and biotechnological applications: A comprehensive review. J. Clean. Prod. 2013; 57:257- 265
12. Park PJ, Lee SH, Byun HG, Kim SH, Kim SK. Purification and Characterization of a Collagenase from the Mackerel, *Scomber japonicus*. J. Biochem. Mol. Biol. 2002;35(6):576-82.
13. Kim SK, Park PJ, Kim JB, Shahid F. Purification and Characterization of a Collagenolytic Protease from the Filefish, *Novodon modestrus*. J. Biochem. Mol. Biol. 2002;35(2):165-71.
14. Hultmann L., Rustad T., Iced storage of Atlantic salmon (*Salmo salar*) – effects on endogenous enzymes and their impact on muscle proteins and texture. Food Chem. 2004; 87:31-41.
15. Hayet BK, Rym N, Bougatef A, Sofiane G, Moncef N. Low molecular weight serine protease from the viscera of sardinelle (*Sardinella aurita*) with collagenolytic activity: Purification and characterisation. Food Chem. 2011; 124:788–94
16. Hultmann L, Phua TM, Tobiassen T, Aas-Hansen, Rustad T. Effects of pre-slaughter stress on proteolytic enzyme activities and muscle quality of farmed Atlantic cod (*Gadus morhua*). Food Chem. 2012;134:1399–1408.
17. Ministério da Pesca e Aquicultura (MPA). Boletim Estatístico da pesca e Aquicultura: Brasil 2011. Ministério da Pesca e Aquicultura: Brasília; 2013.

18. Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO). The State of World Fisheries and Aquaculture FishStat Plus; 2014
19. Teruel SRL, Simpson, BK. Characterization of the collagenolytic enzyme fraction from winter flounder (*Pseudopleuronectes americanus*). Comp. Biochem. Physio. 1995;112:131-136.
20. Adigüzel Ac, Bitlisli Bo, Yasa I, Eriksen NT. Sequential secretion of collagenolytic, elastolytic and keratinolytic proteases in peptide-limited cultures of two *Bacillus cereus* strains isolated from wool. J. Appl. Microbiol. 2009;107:226-34.
21. Bezerra RS, Lins EJJ, Alencar RB, Paiva PMG, Chaves MEC, Coelho LCB. B. et al. Alkaline proteinase from intestine of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). Process. Biochem. 2005;40: 1829-34.
22. Nelson DL, Cox MM. Lehninger: Princípios de Bioquímica. 3ª ed. Sarvier: São Paulo; 2003.

