

UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALAGOAS – UFAL
INSTITUTO DE QUÍMICA E BIOTECNOLOGIA – IQB
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA E BIOTECNOLOGIA

ROBERTA RAYLINE FERREIRA DOS SANTOS

**PURIFICAÇÃO PARCIAL E CARACTERIZAÇÃO DA(S) TRIPSINA(S) DA TRAÍRA
(*HOPLIAS MALABARICUS*)**

MACEIÓ-AL

2019

ROBERTA RAYLINE FERREIRA DOS SANTOS

**PURIFICAÇÃO PARCIAL E CARACTERIZAÇÃO DA(S) TRIPSINA(S) DA TRAÍRA
(*HOPLIAS MALABARICUS*)**

Dissertação de Mestrado apresentado ao Programa de Pós-Graduação em Química e Biotecnologia da Universidade Federal de Alagoas-UFAL, como requisito parcial para a obtenção do grau de mestre em Ciência.

Orientador: Prof. Dr.º Hugo Juarez Vieira Pereira

MACEIÓ-AL

2019

Catálogo na fonte
Universidade Federal de Alagoas
Biblioteca Central
Divisão de Tratamento Técnico
Bibliotecário: Marcelino de Carvalho

S237p Santos, Roberta Rayline Ferreira dos.
Purificação parcial e caracterização da(s) tripsinas(s) da traíra (*Hoplias malabaricus*) / Roberta Rayline Ferreira dos Santos. - 2019
55 f. : il color.

Orientador: Hugo Juárez Vieira Pereira.
Dissertação (Mestrado em ciência) – Universidade Federal de Alagoas.
Instituto de Química e Biotecnologia. Programa de Pós-Graduação em
Química e Biotecnologia. Maceió, 2019.

Bibliografia: f. 51-55.

1. Enzimas. 2. Enzimas proteolíticas. 3. Tripsina. 4. Traíra (Peixe). I.
Título.

CDU: 663.15



PPGQB

Programa de Pós-Graduação em Química e Biotecnologia



FOLHA DE APROVAÇÃO

ROBERTA RAYLINE FERREIRA DOS SANTOS

**“PURIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DA (S) TRIPSINA (S) DA TRAÍRA
(HOPLIAS MALABARICUS)”**

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química e Biotecnologia, como requisito para a obtenção do título de Mestre em Ciências.

Dissertação aprovada em 25 de julho de 2019.

COMISSÃO JULGADORA:

Prof. Dr. Hugo Juarez Vieira Pereira
(PPGQB/IQB/UFAL)

Prof. Dr. Francis Soares Gomes
(PPGQB/IQB/UFAL)

Prof. Dr. José Maria Rodrigues da Luz
(PMBqBM/SBBq/UFAL)

AGRADECIMENTOS

Agradeço imensamente as mulheres que me criaram, educaram e apoiaram toda a minha jornada até aqui, avó Elza, mãe, tia Cida e tia Anja. Vocês são minha inspiração e sem o apoio de vocês nunca teria chegado até aqui.

Ao meu avô Benedito, por ter recheado minha infância com histórias mirabolantes e cuidado de mim todo esse tempo.

Aos meus avós Nadir e Alé, por ter apoiado minha caminhada até a pós-graduação.

Ao meu pai, pelos ensinamentos e apoio.

As minhas irmãs, Rayra, Jullyanny, Maria e Alycia.

Ao professor Dr. Hugo Juarez, por ter me encaminhado na bioquímica e pelo acolhimento no Laboratório de Metabolômica e Proteômica (LAMP).

Aos meus amigos Bruna, Ingrid, Jadielson e Luciana que tive o prazer de conhecer na graduação e pretendo levar por toda a vida.

Ao meu companheiro de mestrado, Ari, pelas inúmeras risadas, discussões e disciplinas compartilhadas.

A minha amiga e companheira de vida acadêmica, Camila, pelas discussões sem fim, pelas conversas aleatórias, pelos momentos inesquecíveis e por sempre está ao meu lado.

Aos meus amigos do LAMP, Ricardo, Laís, Martha, Cláudio, Alexsandra, Dávida, Janaína, Camila Chicuta, Stella e Anny. Em especial a Monizy, por ter sido a primeira pessoa a apresentar o laboratório. A Tatielle, pelas conversas, incentivo e mensagens de apoio. Ao Cledson, por ter tirado todas as minhas dúvidas e ajudado nos momentos que mais precisei durante a pesquisa. A Fabiana, pelos direcionamentos no início do projeto. A Andréa, por todo o apoio emocional, gentileza, cuidado e carinho.

Aos amigos do Laboratório de Bioquímica Metabólica (LBM), Josiel e Antônio Thomas, pelo auxílio nos experimentos.

Ao Programa de Pós-Graduação em Química e Biotecnologia (PPGQB), a Universidade Federal de Alagoas (UFAL) e a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de nível Superior (CAPES).

RESUMO

As vísceras de peixes são parte dos resíduos sólidos descartados após o consumo e processamento desses animais. No entanto, elas podem ser aproveitadas como recurso rico de enzimas. A traíra, *Hoplias malabaricus* (Bloch, 1794), peixe pouco estudado e com poucas informações sobre enzimas produzidas, representa um grande potencial a ser explorado. Além disso, a enzima tripsina pode ser isolada da traíra e apresentar aplicação no âmbito científico e tecnológico. Porém, é necessário antes conhecer as características estruturais e biológicas da enzima de interesse. Diante dessas informações, esse estudo buscou a purificação e caracterização a tripsina da traíra. Com o ceco pilórico da traíra foi feito o extrato bruto, que foi fracionado pela precipitação com etanol e a precipitação com sulfato de amônia. Foram realizados testes de hidrólise enzimática com o substrato N- α -benzoil-L-arginina-4-nitroanilida (BAPNA) em todas as frações das precipitações e foi observado que a fração 20-40% da precipitação salina teve maior atividade. A cromatografia de gel filtração Sephacryl S-100 (60x1 cm) da fração 20-40%, mostrou um pico com alta atividade hidrolítica de tripsina e baixa concentração de proteína, ou seja, alta atividade específica. O SDS-PAGE demonstrou o isolamento da tripsina após precipitação salina e gel filtração na coluna Sephacryl S-100. A enzima parcialmente isolada foi caracterizada e apresentou pH ótimo 9,0 e temperatura ótima de 50 °C, além de ter inibição de 98,95% por fluoreto de fenilmetilsulfonil (PMSF), 94,04% pelo inibidor da tripsina da soja (SBTI) e 94,74% pela benzamidina, mostrando ser uma serinoprotease. A constante cinética para essa enzima teve Km de 1,62 mM e Vmax de 0,69 mM s⁻¹. Conclui-se nesse trabalho que a tripsina da traíra foi parcialmente isolada por dois métodos de purificação e que a enzima mostrou eficiência catalítica em condições de temperatura e pH distintas das demais tripsinas isoladas de peixes, assim demonstrando ter grande potencial para possíveis aplicações biotecnológicas.

Palavras-chave: Enzima. Protease. Tripsina. Peixe.

ABSTRACT

Fish viscera are part of the solid waste discarded after consumption and processing of these animals. However, they can be utilized as a rich resource of enzymes. The traíra, *Hoplias malabaricus* (Bloch, 1794), little studied fish and having scarce of information about the enzymes produced by it, is a fish with great potential to be explored. In addition, the enzyme trypsin can be isolated from the traíra and present application in the scientific and technological field. However, it is necessary to know its structural and biological characteristics. With this information, this work pursued the purification and characterization of trypsin from traíra. With the traíra's pyloric cecum was made a crude extract, which was fractionated by the precipitation with organic solvent and the precipitation with ammonium sulphate. Enzymatic hydrolysis tests were performed with the substrate N- α -benzoyl-L-arginine-4-nitroanilide (BAPNA) in all fractions of the precipitations and it was observed that the fraction 20-40% of the saline precipitation had higher activity. Gel filtration chromatography (Sephacryl S-100 – 60 x 1 cm) of the 20-40% fraction showed a peak with high trypsin hydrolytic activity and low protein concentration, in others words, high specific activity. SDS-PAGE demonstrated the isolation of trypsin after saline precipitation and gel filtration on the Sephacryl S-100 column. . The enzyme isolated was characterized and showed high activity at pH 9.0 and temperature of 50 °C, besides having inhibition of 98,95% by phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF), 94.04% by the soybean trypsin inhibitor (SBTI) and 94,74% by benzamidine, showing to be a serine protease The kinetic constant for this enzyme had Km with 1.62 mM and Vmax with 0.69 mM s⁻¹. It is concluded in this work that trypsin from traíra was partially isolated by two purification methods and that the enzyme showed catalytic efficiency in temperature and pH conditions distinct from others trypsins isolated from fish, thus demonstrating great potential for possible biotechnological applications.

Keywords: Enzyme. Protease. Trypsin. Fish.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Exemplo da espécie <i>Hoplias malabaricus</i> (traíra).....	12
Figura 2: Órgãos internos da traíra.....	13
Figura 3: Distribuição das enzimas comercializadas segundo Rao et al (1998).....	16
Figura 4: Estrutura tridimensional da tripsina bovina (PDB: 1UTN).....	18
Figura 5: Estruturas de híbridos de ressonância da ligação peptídica.....	19
Figura 6: Tríade catalítica das serinoproteases.....	19
Figura 7: Mecanismo de ação de serinoproteases.....	20
Figura 8: Representação da centrifugação diferenciada de um tecido.....	23
Figura 9: Representação da cromatografia líquida.....	27
Figura 10: Hidrólise do substrato cromogênico BApNA na presença da tripsina	28
Figura 11: Gel de eletroforese SDS-PAGE da precipitação com etanol.....	37
Figura 12: Gel de eletroforese SDS-PAGE da precipitação com sulfato de amônia.....	38
Figura 13: Comparação entre os resultados obtidos com a precipitação.....	39
Figura 14: Cromatografia de exclusão molecular com fração F (80-100%).....	40
Figura 15: Cromatografia de exclusão molecular com fração III (20-40%)	41
Figura 16: Gel de eletroforese SDS-PAGE corado com nitrato prata.....	42
Figura 17: Cromatografia de exclusão molecular com fraçãoIV (40-60%)	42
Figura 18: Gel de eletroforese SDS-PAGE da fração IV da precipitação salina.....	43
Figura 19: Análise de temperatura ótima para a tripsina do ceco pilórico da traíra.....	45
Figura 20: Análise do pH ótimo para a tripsina do ceco pilórico da traíra.....	46
Figura 21: Gráfico de Michaelis-Menten para a tripsina purificada do <i>H. malabaricus</i>	47
Figura 22: Zimograma com caseína 0,2% polimerizada em gel de eletroforese.....	49

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Classificação internacional de enzimas.....	14
Tabela 2: Propriedades bioquímicas de tripsinas de diferentes peixes.....	21
Tabela 3: Análise da atividade do extrato bruto do ceco pilórico da Traíra	35
Tabela 4: Atividade enzimática da tripsina nas frações de precipitação com etanol.....	36
Tabela 5: Valores de absorbância das frações resultantes da precipitação salina.....	37
Tabela 6: Tabela contendo diferentes valores de Km	47
Tabela 7: Inibidores utilizados frente a tripsina isolada do ceco pilórico da traíra.....	48

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

Arg	Arginina
Asp	Ácido aspártico
BAPNA	N- α -benzoil-L-arginina-4-nitroanilida
EC	<i>Enzyme Commission</i> (Comissão de Enzima)
ExBr1	Extrato bruto 1
ExBr2	Extrato bruto 2
His	Histidina
IBGE	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
K_M	Constante de Michaelis-Menten
mM	Milimolar
Lys	Lisina
pH	Potencial hidrogênio
Phe	Fenilalanina
PMSF	Fluoreto de fenilmetilsulfonil
SBTI	Inibidor da tripsina da soja
SDS	Dodecil sulfato de sódio
SDS-PAGE	Eletroforese em gel de poliacrilamida com dodecil sulfato de sódio
Ser	Serina
Trp	Triptofano
Tyr	Tirosina
UV	Ultravioleta

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	10
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	12
2.1 Traíra	12
2.2 Enzimas	13
2.2.1 Proteases	14
2.2.2 Tripsina	18
2.3 Purificação de Tripsinas	22
2.3.1 Extrato Bruto	22
2.3.2 Precipitação Fracionada	23
2.3.3 Cromatografia Líquida.....	25
2.3.4 Cromatografia de Exclusão Molecular ou Gel Filtração	25
2.3.5 Cromatografia de Troca Iônica	25
2.3.6 Cromatografia de Afinidade.....	26
2.3.7 Acompanhamento da Purificação.....	27
2.3.7.1 Eletroforese	27
2.3.7.2 Substratos cromogênicos.....	28
7 OBJETIVOS	29
7.1 Objetivo Geral.....	29
7.2 Objetivos Específicos	29
3 METODOLOGIA	30
3.1 Coleta do Material.....	30
3.2 Preparo do Extrato Bruto	30
3.3 Determinação da Atividade Enzimática	30
3.4 Precipitação Salina e com Solvente Orgânico	31
3.5 Cromatografia por Exclusão Molecular (Gel Filtração).....	31
3.6 Eletroforese SDS-PAGE.....	32
3.7 Teste de Temperatura Ótima.....	32
3.8 Teste de pH Ótimo	32
3.9 Cinética Enzimática.....	33
3.10 Teste de inibição.....	33
3.11 Zimograma.....	33
3.12 Análise estatística	34
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	35

4.1 Extrato Bruto.....	35
4.2 Precipitação Fracionada.....	36
4.2.1 Precipitação com Solvente Orgânico.....	36
4.2.2 Precipitação Salina	37
4.3 Cromatografia de Gel Filtração.....	39
4.4 Caracterização Enzimática.....	44
4.4.1 Temperatura Ótima.....	44
4.4.2 pH Ótimo	45
4.4.3 Cinética Enzimática.....	46
4.4.4 Teste de inibição.....	47
4.4.5 Zimograma	48
5 CONCLUSÃO	50
REFERÊNCIAS	51

1 INTRODUÇÃO

No Brasil o consumo de peixe vem aumentando a cada ano. Segundo dados do Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE), 483 mil toneladas de peixe foram produzidas em 2015. Algumas partes do peixe como, cauda, nadadeira, vísceras, escamas, pele, ossos, são consideradas lixo (BLANCO et al, 2007). Os resíduos de peixes descartados indevidamente tornaram um problema ambiental, visto que os restos do animal são perecíveis. No entanto, as vísceras do peixe, um subproduto, podem ser aproveitadas como um recurso rico em enzimas digestivas. (BOUGATEF, 2013; BLANCO et al, 2007).

As enzimas são macromoléculas usadas pelos organismos vivos como catalisadores das reações nos sistemas biológicos. As enzimas são divididas em seis classes, de acordo com as reações que elas catalisam (NELSON e COX, 2014). As hidrolases são uma das seis classes enzimáticas, responsáveis por catalisar reações de hidrólise, dentro dessa classe encontram-se às peptidases (VOET et al, 2008). As peptidases, tais como a tripsina, possuem grande valor para a indústria de enzima, impactando em 60% no mercado de venda de enzimas devido à variada aplicação na indústria de detergentes, comida, agroquímica e farmacêutica (BOUGATEF, 2013).

Uma das principais enzimas digestivas das vísceras de peixes é a tripsina, característica por clivar a ligação peptídica dos resíduos de aminoácidos arginina (Arg) ou lisina (Lys) na região do grupo carbonila. Dessa forma, uma alternativa de aproveitar as vísceras do peixe é através do isolamento e purificação da tripsina, podendo desenvolver novas proteínases com baixo custo de produção e aplicável na indústria como na de detergentes, couro, alimentos e medicamentos (BOUGATEF, 2013).

A busca por tripsinas que tenham maior poder catalítico e que sejam resistentes às condições impostas pelas indústrias que utilizam essas proteases é estimulada. Um exemplo é a indústria de detergentes que busca por enzimas alcalinas, sendo as serinas proteases as mais usadas. Já na indústria têxtil, o processamento do material passa por várias operações, sendo requisitadas enzimas com diferentes características (GURUMALLESH et al, 2019), por exemplo, como na abrasão do jeans, em que são usadas enzimas com estabilidade em pH 6-8 e também em pH 4-6. (OLSEN, 2004)

A traíra é um peixe de água doce que vive em ambientes lênticos e possui registros da Argentina, Brasil a Costa Rica (SANTOS 2013). As vísceras da traíra pode ser uma fonte

de enzima hidrolíticas. Alencar et al (2003) realizou estudos com resíduos da traíra e identificou que a maior atividade proteolítica desse peixe estava no ceco pilórico e, que várias enzimas eram responsáveis pela atividade proteolítica alcalina. Porém, as enzimas não foram purificadas e caracterizadas. Kona et al (2018) relatou a purificação da tripsina do ceco pilórico da traíra por precipitação com sal e cromatografia de afinidade, com pH ótimo de 8,0 e estabilidade térmica entre 40-60 °C.

Sabendo de tais informações, e levando em consideração que a traíra é um peixe carnívoro, então provavelmente tem alta atividade enzimática para a digestão. E, também, que a obtenção de proteases tem custo elevado. O trabalho tem por objetivo purificar e caracterizar a(s) tripsina(s) da traíra (*Hoplias malabaricus*), visando aproveitar partes do peixe que seriam descartadas, e usar de métodos que gerem baixos custos para produção de proteases.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Traíra

A espécie *Hoplias malabaricus* (Bloch, 1794), popularmente conhecida no Brasil como traíra, Figura 1, é um peixe neotropical¹ de água doce. Possui ocorrência em quase todas as bacias hidrográficas da América do Sul, com registros da Argentina até a Costa Rica. É da família Erythrinidae pertencente à ordem dos Characiforme que tem como exemplares a piranha, lambari, curimba e dourado. Possuem como características morfológicas o corpo alongado e cilíndrico, com manchas escuras em forma de listras irregulares, a mandíbula ultrapassando fracamente a maxila superior e dentes pontiagudos (PESSOA et al., 2013; LIMA et al, 2016; SANTOS, 2013; MARTINS, 2009).

Figura 1: Exemplar da espécie *Hoplias malabaricus* (traíra).



Fonte: Google, 2019.

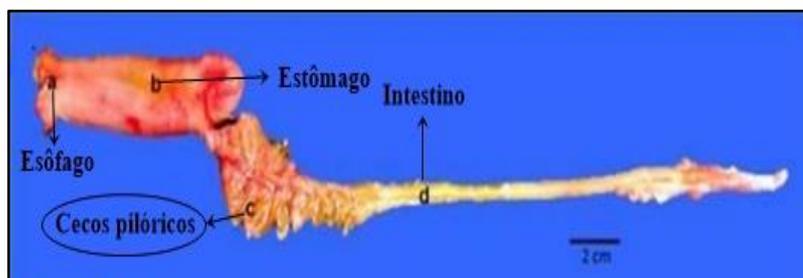
É um peixe que tem preferência por ambientes lânticos, é predador, do tipo que faz tocaia para capturar a presa, possui dieta carnívora, alimentando-se exclusivamente de peixes na fase adulta. A traíra possui período de reprodução entre agosto e janeiro, no qual a fêmea faz desova parcelada em ninhos e o macho os fertilizam até eclodirem (PESSOA et al., 2013; LIMA et al, 2016; SANTOS, 2013; MARTINS, 2009).

O sistema digestório da Traíra é composto por quatro partes: esôfago, estômago, o ceco pilórico no início do intestino e o intestino, Figura 2 (PESSOA et al., 2013). O esôfago tem a função de levar o alimento da boca até o estômago, já o estômago mantém o alimento por algum tempo até que a digestão ácida aconteça. O ceco pilórico tem como função

¹ É a região biogeográfica que compreende o território da América do Sul e do México (Amorim e Pires, 1996).

aumentar a área de absorção do intestino, digerindo proteínas e lipídeos provindos da dieta, além de auxiliar na absorção de nutrientes (ROTTA, 2003).

Figura 2: Órgãos internos da traíra.



Fonte: Pessoa et al., 2013

Em muitas comunidades pesqueiras, a traíra é usada como alimento devido a sua abundância em áreas dulciaquícolas (LIMA et al, 2016). O IBGE estimou que mil toneladas de traíras foram produzidas no Brasil em 2015, correspondendo a 0,2% da produção de total de peixes. Comparado a produção de outros peixes de água doce, como a tilápia que teve produção de 219,33 mil toneladas em 2015 correspondendo a 45,4% do mercado pesqueiro no Brasil, a traíra possui uma produção pequena. No entanto, ela possui uma característica que a distingue dos demais peixes, a sua dieta carnívora. Segundo Eshel et al (1993), a tripsina contribui com cerca de 40-50% da atividade digestiva de espécies carnívoras. Levando em consideração tal fato, é esperado que a atividade enzimática digestiva da Traíra esteja ligada a tripsina e seja maior do que outros peixes como, por exemplo, da própria tilápia.

2.2 Enzimas

Para manter um organismo vivo funcionando várias reações ocorrem conjuntamente e em tempo adequado. Isso só é possível devido à presença de enzimas, que são catalisadores biológicos responsáveis por aumentar a velocidade das reações em sistemas vivos. Na presença de enzimas, as reações ocorrem no tempo adequado para gerar produtos importantes para o metabolismo dos organismos vivos. A ausência de catálise leva a reações como, por exemplo, a de hidrólise de proteínas durar entre 10 a 10.000 anos para ocorrer em pH neutro. (CAMPBELL e FARREL, 2007; BERG et al, 2004).

As enzimas são macromoléculas que possuem como principais características a sua alta especificidade, agir sobre condições amenas de temperatura e pH e acelerar reações

químicas, chegando a ter poder catalítico superior à de catalisadores sintéticos ou inorgânico. Assim como qualquer proteína, as enzimas possuem suas atividades relacionadas às suas conformações nativas, podendo perder ou diminuir sua atividade quando as conformações são comprometidas (NELSON e COX, 2014).

Com descoberta de novas enzimas, foi necessário desenvolver um sistema de classificação para enzimas de acordo com as reações catalisadas por elas. Cada enzima recebe números dados pela Comissão de Enzimas (*Enzyme Commission* - EC) (RODEWELL e KENNELLY, 2006). As enzimas têm 6 classes: oxidorreduções, transferases, hidrolases, liases, isomerases e ligases, Tabela 1.

Tabela 1: Classificação internacional de enzimas.

Classe nº	Nome da classe	Tipo de reação catalisada
1	Oxidorreduções	Transferência de elétrons.
2	Transferases	Reações de transferência de grupos.
3	Hidrolases	Reações de hidrólise.
4	Liasas	Eliminação de grupos para formar ligações duplas.
5	Isomerases	Isomerização.
6	Ligases	Formação de ligações acopladas à hidrólise de ATP.

Fonte: Adaptado de Nelson e Cox, 2014

As hidrolases são enzimas que catalisam a clivagem da ligação química seguida da adição da molécula de água. (RAWLING et al, 2007; REECE et al, 2015). Dentro da classe das hidrolases encontram-se as proteases, que são responsáveis por catalisar a clivagem hidrolítica das ligações peptídicas. As proteases estão presentes em uma gama de processos biológicos entre eles a digestão de alimentos, ativação de proteínas, coagulação sanguínea, reciclagem de proteínas intracelular, apoptose, angiogênese e outros (RAWLING et al, 2007).

2.2.1 Proteases

As proteases é uma classe de enzima muito diversa e recebe uma classificação própria de acordo com a EC. As proteases podem ser divididas em dois grupos:

A) endopeptidases, que clivam as ligações peptídicas das cadeias internas de polipeptídeos, que por sua vez são divididas de acordo com o grupo químico presente no sítio ativo (serina, cisteína, ácido aspártico e metalo-proteases);

B) exopeptidases, que hidrolisam as extremidades aminoterminal (aminopeptidases) ou carboxiterminal (carboxipeptidases) de polipeptídeos (BOUGATEF, 2013; RAO et al, 1998).

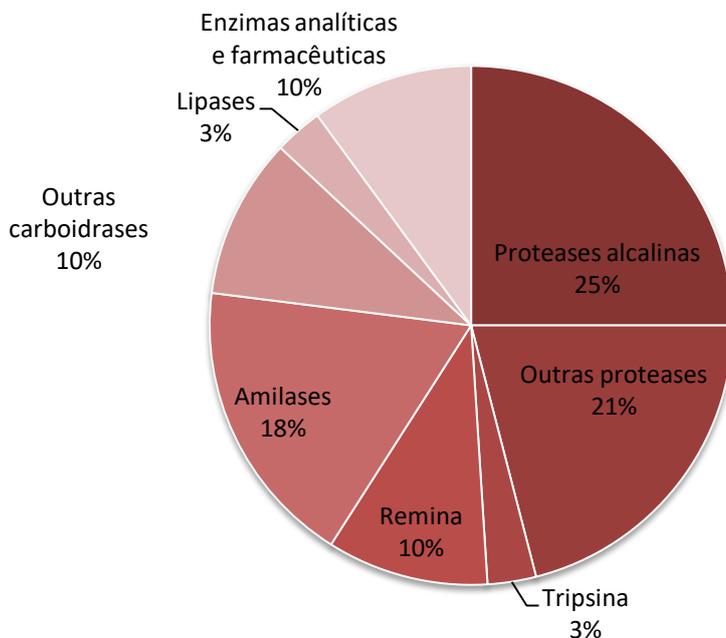
As proteases desempenham vários papéis biológicos através de cascatas de reações² (RAWLING et al, 2007). Algumas das funções das proteases em sistemas vivos são:

- a) Digestão de proteínas: quando as proteínas da dieta chegam ao intestino, a enzima enteropeptidase é ativada e converte o tripsinogênio encontrado no pâncreas na sua forma ativa, a tripsina. Por sua vez, a tripsina ativa outras enzimas digestivas proteolíticas, como a quimiotripsina e a carboxipeptidases A e B, além de auxiliar na ativação de outras tripsinas e na digestão de proteínas da dieta (GRANNER, 2006).
- b) Coagulação sanguínea: após uma lesão no tecido, o zimogênio X é convertido na sua forma ativa, a protease fator Xa. Junto com a proteína fator V3, a protease Xa age convertendo o zimogênio protrombina na sua forma ativa, a trombina, e direcionando essa protease ao local da lesão. A partir de então ocorre uma série de reações, na qual a trombina cliva proteoliticamente a glicoproteína fibrinogênio e a converte em fibrina, formando coágulos de fibrina. Após a integridade da área lesionada ser recuperada, mais uma vez uma protease irá agir, dessa vez será a serino protease plasmina que clivará a fibrina (NEURATH e WALSH, 1976).
- c) Apoptose: a apoptose é a morte celular programada, processo pelo qual células danificadas ou infectadas são eliminadas. Nos seres humanos, a apoptose ocorre através da sinalização realizada por uma célula vizinha a célula danificada. A partir disso, os precursores procaspases são ativados e convertidos nas proteases caspases, que por sua vez auxiliam na ativação de outras enzimas de caspases, causando a morte celular programada (REECE et al, 2015; BERG et al, 2004).

² Cascatas de reações ocorrem após um sinal inicial, o qual desencadeia reações em sequência. Em cada nova etapa reacional o sinal amplifica e gera produtos para a próxima etapa (REECE et al, 2015).

Na indústria, as proteases representam 60% do mercado de enzimas, participando em uma variedade de segmentos, ocupando lugar de destaque entre as demais enzimas, Figura 3 (RAO et al, 1998).

Figura 3: Distribuição das enzimas comercializadas segundo Rao et al (1998).



Fonte: Adaptado de Rao et al, 1998.

As vantagens do uso de proteases pela indústria estão na capacidade dessa classe de enzimas em hidrolisar regiões específicas de proteínas e peptídeos, produção em larga escala e alta atividade. O que a torna amplamente utilizada em vários segmentos industriais. Como exemplo, tem-se a indústria farmacêutica, que usa proteases para o desenvolvimento de agentes terapêuticos, a ciência básica, a qual emprega proteases para auxiliar na elucidação de estruturas, síntese de peptídeos e sequenciamento de proteínas, além da indústria de detergentes, couro e alimentos que usam extensivamente proteases (ANWER e SALEEMUDDIN, 1998; RAWLING et al, 2007; RAO et al, 1998):

- 1) Indústria de detergentes - proteases são usadas em soluções de detergentes desde a década de 30, sendo o mercado de detergentes um dos que mais empregam proteases em suas formulações. Para essa finalidade, uma protease ideal deve ter substrato amplo para assegurar a remoção de uma variedade de manchas, boa atividade em pH alcalino e temperatura acima de 40 °C, e manter a estabilidade na presença de agentes quelantes e

oxidantes contidos nas soluções de detergentes. (OLSEN, 2004; ANWER e SALEEMUDDIN, 1998; RAO et al, 1998).

- 2) Indústria de couro - a aplicação de proteases na indústria de couro veio como uma alternativa para diminuir a poluição, produção de efluentes e custo econômico, fatores causados pelo sulfeto de sódio usado no processamento de couro. Proteases alcalinas agem hidrolisando proteínas solúveis, removendo o sal e facilitando a entrada de água, assim auxiliado na remoção do cabelo presente no couro. A tripsina é uma das proteases usadas para o processamento de couro, junto com proteases geradas pelo fungo *Aspergillus sp* e a bactéria *Bacillus sp* (ANWER e SALEEMUDDIN, 1998; RAO et al, 1998; OLSEN, 2004).
- 3) Indústria de alimentos - dentro da indústria alimentícia, as proteases podem ser empregadas em vários processos como, por exemplo, a fabricação de queijos, panificação, amaciamento de carnes e entre outros (RAO et al, 1998). Na indústria de laticínios, a coagulação do leite é realizada por proteases aspárticas de origem microbiana ou animal, com a função de acidificar o leite e dar sabor ao queijo (ANWER e SALEEMUDDIN, 1998; RAO et al, 1998). Na área de panificação, as proteases bacterianas tiveram melhores resultados, sendo extensivamente usadas para hidrolisar o glúten do trigo. A finalidade é de melhorar o manuseio, dando elasticidade a massa, reduzir o tempo de mistura e gerar pães mais volumosos (OLSEN, 2004).

Devido à grande diversidade de proteases e a especificidade delas, essa classe de enzimas vem sendo exploradas para inúmeras aplicações biotecnológicas. Porém, sua aplicação só é possível após a purificação da protease de interesse que, inicialmente, está presente em uma mistura de outras enzimas e compostos.

As proteases podem ser originadas de animais, plantas e microrganismos, no entanto, as indústrias que utilizam as proteases em sua grande maioria não revelam a espécie que derivou a enzima. Outro fator é a produção de proteases que pode ter custo elevado, além de problemas relacionados à estabilização enzimática. Um bom catalisador industrial deve ser estável nas condições as quais é submetido, já que pode sofrer autólise em ambiente não fisiológico (ANWAR e SALEEMUDDIN, 1998). Em condições fora do padrão fisiológico, como temperatura e pH extremos, a protease pode perder sua conformação nativa, enfraquecendo suas interações intermoleculares, perdendo sua estrutura tridimensional e expondo seus resíduos, que podem formar agregados insolúveis a partir de interações entre os

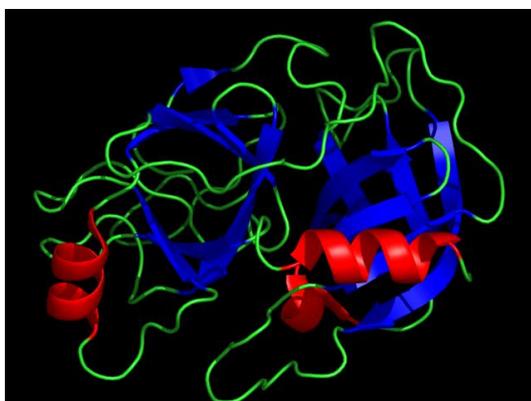
resíduos hidrofóbicos (IVERSON et al, 2013, RODEWELL e KENNELLY, 2006). Dessa forma, constantemente vem-se procurando formas de obter proteases através de métodos que minimize o custo de produção dessas enzimas, que atendam uma demanda específica e possuam uma boa estabilidade frente a várias condições. (BOUGATEF, 2013; RAO et al, 1998; RAWLING et al, 2007; OLIVEIRA, 2014; ANWAR e SALEEMUDDIN, 1998).

Uma das formas de obter proteases é através do reaproveitamento de resíduos de peixes. A tripsina é uma serinoprotease com aplicações em áreas da indústria de detergente, farmacológica e ciência básica. Apenas a tripsina corresponde a 3% do mercado mundial de enzimas, demonstrando ter papel de destaque entre as enzimas comercializadas. Atualmente, tem-se explorado a obtenção da tripsina por meio de resíduos de peixe que são descartados em rios, ou no lixo comum, e não possuem valor comercial (BOUGATEF, 2013; RAO et al, 1998; RAWLING et al, 2007; OLIVEIRA, 2014)

2.2.2 Tripsina

A tripsina é uma serinoprotease e tem no seu sítio ativo a tríade catalítica composta pelos resíduos de aminoácidos serina (Ser195), histidina (His57) e ácido aspártico (Asp102), (BOUGATEF, 2013, RAWLINGS et al, 2007). A tripsina é uma enzima digestiva que hidrolisa proteínas da dieta, Figura 4. Por ser altamente reativa, nos seres humanos a tripsina é sintetizada no pâncreas na sua forma inativa, o zimogênio tripsinogênio (CONN e STUMPF, 1980). A ativação da tripsina ocorre quando o tripsinogênio é secretado no intestino delgado e ativado pela enteropeptidase (GRANNER, 2006).

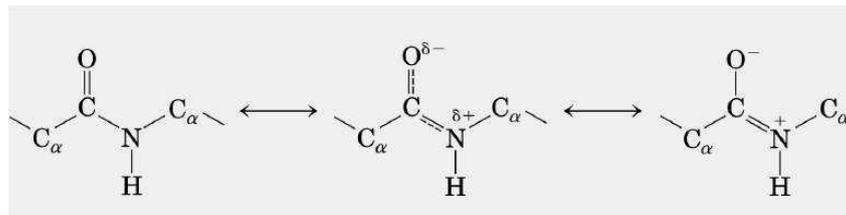
Figura 4: Estrutura tridimensional da tripsina bovina (PDB: 1UTN)



Fonte: Leiros et al, 2003.

A hidrólise de proteínas pela tripsina tem como principal obstáculo à ligação peptídica. Os híbridos de ressonância da ligação peptídica dão a característica de ligação dupla parcial à essa ligação química. O que torna as ligações resistentes à ação de proteases, fortalecendo a ligação carbono-nitrogênio e tornando a carbonila pouco suscetível ao ataque nucleofílico, Figura 5 (BERG et al, 2004).

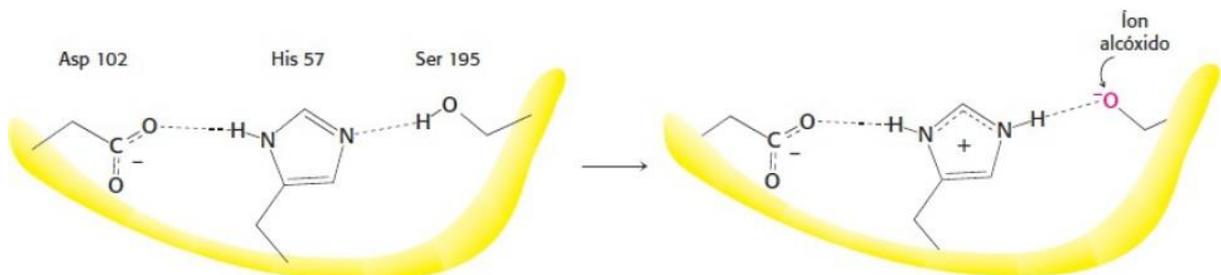
Figura 5: Estruturas de híbridos de ressonância da ligação peptídica.



Fonte: Carey e Sundberg, 2007.

Para hidrolisar as proteínas da dieta, a tripsina age por mecanismo de reação semelhante à de outras serinoproteases. Sua tríade catalítica está disposta de modo a ficarem próximas para o reconhecimento do substrato e ataque nucleofílico da ligação peptídica, Figura 6 (YANG et al, 2015) . Após o reconhecimento do substrato, His57 polariza a ligação do grupo hidroxila da serina para que ocorra a desprotonação da Ser195, fazendo a His57 receber um próton, formar o íon alcóxido e tornar a Ser195 um nucleófilo poderoso. E o Asp102 colabora posicionando a His57 para ser um aceptor de prótons, Figura 7 (BERG et al, 2004.)

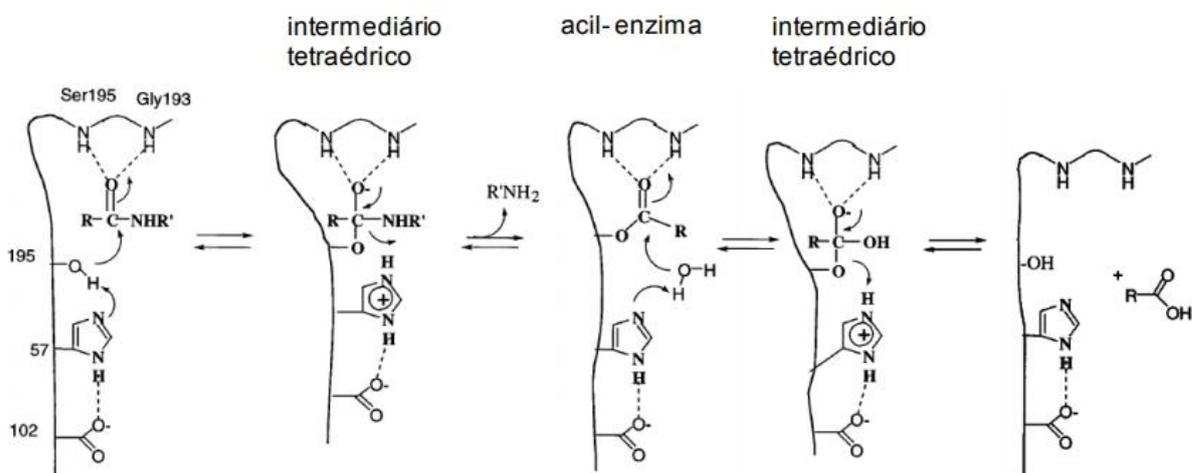
Figura 6: Tríade catalítica das serinoproteases (esquerda). Desprotonação e conversão da Ser195 em um nucleófilo poderoso.



Fonte: Berg et al, 2004.

Com a modificação da Ser195, o oxigênio desse resíduo faz o ataque nucleofílico a carbonila da ligação química do substrato, levando a clivagem da ligação e a transferência de um próton da His57 para a amina da ligação. Essa reação resulta na formação do complexo acil-enzima³ e liberação de uma amina. A próxima etapa da reação de hidrólise é a entrada de uma molécula de água e a desacilação. Isso ocorre quando a His57 retira um próton da molécula de água, formando o íon hidroxila (OH⁻), que por sua vez ataca a carbonila do grupo acila, assim liberando um ácido carboxílico e restaurando a enzima para catalisar mais substratos (BERG et al, 2004; YANG et al, 2015).

Figura 7: Mecanismo de ação de serinoproteases.



Fonte: Reis, 2009.

A diferença da tripsina para as demais enzimas inseridas na sua classe é a especificidade. A tripsina tem como característica primordial a capacidade de clivar, por meio de hidrólise, apenas as ligações peptídicas do lado da carbonila dos resíduos de aminoácidos arginina (Arg) e lisina (Lys) (BOUGATEF, 2013).

Em meio alcalino, a tripsina possui sua atividade ótima entre o pH 7,0 – 11,0 e, também em temperaturas que variam entre 35-60 °C, sendo que em pH ou temperatura extremas, a tripsina tende a perder sua atividade. Os inibidores de serinoproteases também conseguem inibir a tripsina. Um desses inibidores é o fluoreto de fenilmetano sulfonil (*phenyl-methyl-sulfonyl fluoride* – PMSF) e, também, o inibidor da tripsina da soja (*soybean trypsin inhibitor* – SBTI) (BOUGATEF, 2013).

³ O substrato se liga a enzima de forma covalente por meio do grupo acila, assim formando o complexo acil-enzima (BERG et al, 2004)

Uma das formas de obter a tripsina é através de sua purificação a partir de subprodutos derivados dos peixes. Estudos com relação a proteases encontradas em peixes vêm sendo desenvolvidos desde 1940, no entanto, ainda há proteases de peixes com características, composição e aplicações desconhecidas. As vísceras do peixe correspondem a 20% da biomassa do peixe e é uma fonte de proteases digestivas que podem ser aplicadas em vários segmentos da indústria. No entanto, para aplicação biotecnológica de proteases é necessário purificar e caracterizar essas enzimas (BEZERRA et al, 2005; SILVA et al, 2011).

Nos últimos anos tem-se purificado e caracterizado tripsina de várias espécies de peixes. Assim, abrangendo o conhecimento a cerca da tripsina, suas características e seu potencial biotecnológico. Alguns das tripsinas caracterizadas de peixes de água doce podem ser vistas na tabela 2.

Tabela 2: Propriedades bioquímicas de tripsinas de diferentes peixes de água doce.

Peixe	Massa molecular (kDa)	Temperatura ótima (°C)	pH ótimo	Referência
Barbela tunisiana (<i>Barbus callensis</i>)	24	55	10,0	Sila et al (2012)
Pirarucu (<i>Arapaima gigas</i>)	27	65	9,0	Freitas-Júnior et al (2012)
Tilápia híbrida (<i>O. niloticus</i> _ <i>O. aureus</i>)	22	60	9,0	Wang et al (2010)
Tambaqui (<i>Colossoma macropomum</i>)	23,9	50	9,0	Marcuschi (2010)
Bonito (<i>Katsuwonus pelamis</i>)	24	60	8,5	Klomklao et al (2007)
Tilápia-do-Nilo (<i>Oreochromis niloticus</i>)	23,5	50	8,0	Bezerra et al (2005)
Caitipa mojarra (<i>Diapterus rhombeus</i>)	26,5	50	8,5	Silva et al (2011)
Pacamã (<i>Lophiosilurus alexandri</i>)	24	50	9,0	Santos (2016)

Fonte: Adaptada de Boutaf, 2013.

2.3 Purificação de Tripsinas

Para entender as funções e as propriedades bioquímicas das tripsinas é necessário compreender mais a cerca da sua estrutura e atividade enzimática. Compreender todos esses aspectos requer o isolamento da protease de interesse para obter sua forma pura. Isso é possível a através de técnicas desenvolvidas para isolar biomoléculas, a qual são baseadas em propriedades como solubilidade, carga, pH e tamanho da molécula de interesse. Além disso, há uma tendência em minimizar os processos necessários para purificar proteínas, para reduzir tempo de purificação, o custo econômico e ter maior rendimento. (NELSON e COX, 2014; BERG et al, 2004).

2.3.1 Extrato Bruto

O primeiro passo para purificação consiste em extrair a proteína da fonte original (SCOPES, 1993). Em estudos de purificação de tripsina de peixes, os órgãos mais usados para extrair proteases foram o ceco pilórico (MARCUSCHI, 2010; FREITAS-JÚNIOR, 2012; SANTOS et al, 2016), o pâncreas (CHONG et al, 2004) e o intestino (VILLALBA-VILLALBA, 2013; CHONG et al, 2002; BEZERRA et al, 2005). Para extrair a tripsina de um órgão é realizada a desintegração da parede celular do tecido. A mistura contendo várias proteínas é liberada para uma solução tampão. Uma vez que a protease de interesse é a tripsina, uma enzima alcalina, é recomendado que a solução tampão seja básica, para simular as condições fisiológicas a qual a tripsina estava inserida.

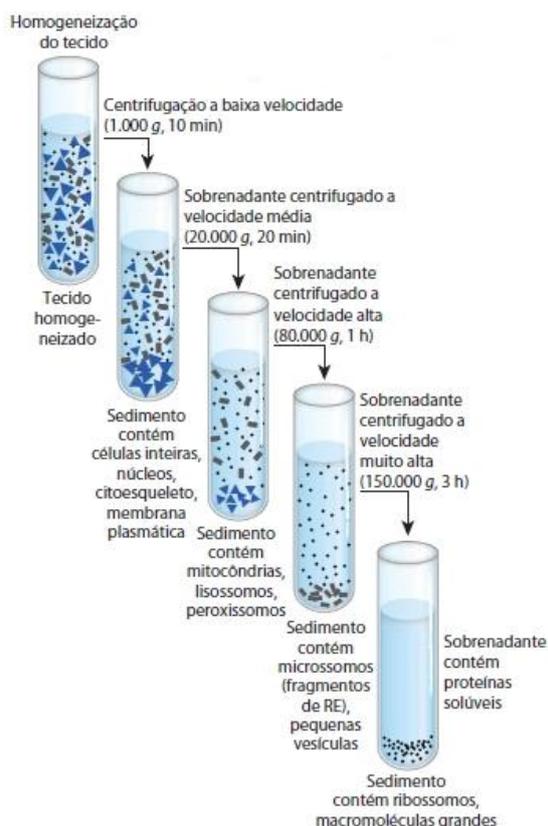
A centrifugação é uma das formas convencionais mais usadas de extrair proteases de tecidos e obter o extrato bruto. A partir desse método é possível retirar gorduras e células insolúveis do extrato bruto. Para isso, o homogeneizado⁴ é centrifugado, formando um precipitado sólido e um sobrenadante líquido, sendo este último nomeado de extrato bruto e onde está presente a protease. Algumas vezes, o volume de sobrenadante é insuficiente para preparar um extrato bruto. Quando surge essa dificuldade, o homogeneizado pode ser centrifugado várias vezes, aumentando gradativamente a velocidade de centrifugação. Essa técnica é conhecida como centrifugação diferenciada, Figura 8 (SCOPES, 1993).

Após a preparação do extrato bruto, deve-se levar em consideração que essa amostra ainda é composta por várias proteínas. Para analisar as propriedades da tripsina, que pode está

⁴ O tecido ou célula microbiana rompido por meio de ação mecânica.

contida nessa amostra, é preciso empregar técnicas de separação até obter uma amostra com a tripsina pura. As técnicas de separação podem ser aplicadas sequencialmente, considerando propriedades como tamanho, carga, polaridade e solubilidade das proteínas, para eliminar contaminantes e separar a tripsina das demais proteínas (CAMPBELL e FARREL, 2007).

Figura 8: Representação da centrifugação diferenciada de um tecido.



Fonte: NELSON e COX, 2014.

2.3.2 Precipitação Fracionada

A precipitação fracionada é uma técnica de separação que se baseia na solubilidade das proteínas, já que cada proteína solubiliza em faixas de concentrações diferentes de soluto ou solvente (CAMPBELL e FARREL, 2007).

Geralmente, sais são empregados para realizar a precipitação fracionada através do método chamado de *salting out*. Diante de alguns sais, as proteínas diminuem sua solubilidade à medida que a concentração de sal aumenta, já que começam a competir com o sal pelas moléculas de água, até se tornarem insolúveis e precipitarem. Levando em consideração que as proteínas possuem tamanho e carga líquida diferentes, e que a

solubilidade depende dessas propriedades, proteínas diferentes vão precipitar em faixas de concentração diferente. E dessa forma é possível separar as proteínas. Os sais que podem ser usados incluem o cloreto de sódio (NaCl), sulfato de sódio (Na₂SO₄) e o sulfato de amônia ((NH₂)₄SO₄), sendo este último o mais usualmente empregado. As vantagens de usar o (NH₂)₄SO₄ está na sua alta solubilidade em água, baixo custo e de prevenir o crescimento bacteriano em soluções, assim mostrando ser bastante eficaz para precipitação (MARCUSCHI, 2010; WATANABE, 2004; ENGLARD e SEIFTER, 1990). O sulfato de amônia é o sal amplamente usado na precipitação fracionada para obter tripsina a partir de peixes, sendo usado em trabalhos como de VILLALBA-VILLALBA, 2013; CHONG et al, 2002; BEZERRA et al, 2005; SOUZA, 2018; SANTOS, 2018.

Os solventes orgânicos também são empregados para precipitar proteínas. Entre os solventes destaca-se o metanol (CH₃OH), etanol (C₂H₅OH), butanol (C₄H₉OH) e a propanona (C₃H₆O, popularmente conhecido como acetona), sendo o etanol e acetona os mais utilizados por serem miscíveis na água. No extrato bruto, os solventes orgânicos agem diminuindo a capacidade da água de solvatar proteínas à medida que a concentração do solvente aumenta. Quando o solvente orgânico entra em contato com o extrato bruto, os grupos polares do solvente orgânico competem com água pela proteína, deslocando as moléculas de água parcialmente e deixando a proteína menos hidratada. Dessa forma, há um aumento na atração entre cargas opostas das proteínas e diminuição da solubilidade, resultando em um agregado que precipitará. A desvantagem do uso de solventes orgânicos é que tanto etanol quanto acetona podem agir no núcleo de proteínas globulares, desestabilizando-as (WATANABE, 2004; ENGLARD e SEIFTER, 1990).

No processo de purificação da tripsina, em alguns casos é necessário remover da amostra compostos pequenos, por exemplo, como o sal e o etanol. A diálise é uma técnica na qual é possível retirar as moléculas pequenas das amostras. Para isso, a amostra é inserida em uma membrana semipermeável, que é submersa em uma solução tampão. Moléculas pequenas passarão pelos poros da membrana semipermeável, enquanto moléculas com tamanho maior, como as proteínas, ficarão retidas. Desse modo, a diálise pode ser aplicada para retirar sal ou etanol de amostras resultantes da precipitação fracionada (SCOPES, 1993).

2.3.3 Cromatografia Líquida

A cromatografia líquida está associada a várias técnicas de separação de moléculas. Cada técnica separa as moléculas a partir de propriedades como carga, tamanho e afinidade. Porém, todas essas técnicas possuem os componentes básicos da cromatografia líquida. A cromatografia líquida é constituída por uma coluna (fase estacionária) e uma solução tampão que migra pela coluna (fase móvel). A amostra é inserida no topo da coluna e a solução tampão, fase móvel, escoar sobre a amostra, deslocando-a pela fase estacionária (NETO e NUNES, 2003).

2.3.4 Cromatografia de Exclusão Molecular ou Gel Filtração

A cromatografia de gel filtração é usada quando o objetivo é separar as proteínas pelo tamanho, Figura 9-a. A coluna desta cromatografia é feita de polímeros insolúveis com poros de diferentes diâmetros. Quando a amostra é aplicada no topo da coluna, as moléculas pequenas ficam presas nos poros e migram mais lentamente pela coluna, enquanto as moléculas com tamanho maior terão migração mais rápida, saindo da coluna primeiro. Alguns fatores influenciam a ter uma boa resolução na cromatografia de gel filtração. A resolução é dada como a raiz quadrada da altura da coluna (\sqrt{h}), assim colunas longas terão uma boa resolução permitindo que proteínas com tamanho intermediário se difundam mais pela coluna. Outro fator que influencia a resolução é volume pequeno de amostra, pois evita a sobreposição de picos (STELLWAGEN, 1990; GENERAL ELECTRIC COMPANY, 2010). A cromatografia de gel filtração é, geralmente, a primeira técnica cromatográfica a ser empregada na purificação de tripsinas. Em alguns casos, a gel filtração é a única cromatografia usada para purificar a tripsina, como foi relatado por Bezerra et al (2005), Marcuschi (2010) e Silva et al (2011).

2.3.5 Cromatografia de Troca Iônica

Na cromatografia de troca iônica é possível separar as proteínas, enzimas, ácidos nucleicos e outras biomoléculas através da carga líquida em determinados pHs, Figura 9-b. Em alguns trabalhos, a cromatografia de troca iônica é usada como segundo passo cromatográfico para a purificação, como em Klomklao et al (2007), Sila et al (2012) e Wang et al (2010). A coluna para realizar a cromatografia de troca iônica é composta por polímeros sintéticos com grupos carregados. A troca iônica pode ser realizada com a coluna com grupos

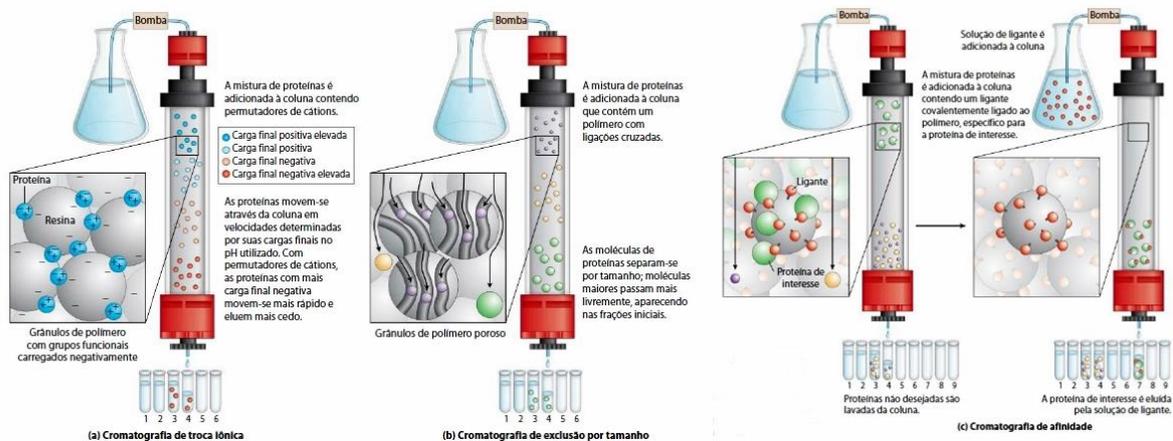
carregados positivamente (trocadora de ânions), ou carregados negativamente (trocadora de cátions). Na trocadora de ânions, proteínas com grande extensão de carga negativa vão se ligar a coluna, enquanto as proteínas com carga majoritariamente positiva serão eluídas primeiro da coluna. E na trocadora de cátions, as proteínas com carga positiva irão se ligar a coluna, ao mesmo tempo em que as proteínas com carga negativa vão sair primeiras já que não interagem com a coluna. Nessa cromatografia, a resolução depende da forma como a amostra é eluída. A eluição é feita com uma solução salina com força iônica maior do que da coluna, assim conseguindo desprender as proteínas que estavam ligadas a coluna e aumentando a concentração da amostra (GENERAL ELECTRIC COMPANY, 2016; ROSSOMANDO, 1990).

2.3.6 Cromatografia de Afinidade

A cromatografia de afinidade é um dos métodos de purificação de proteínas mais poderoso devido sua especificidade, Figura 9-c. Neste método, as proteínas são separadas de acordo com afinidade delas pela coluna. Nos trabalhos realizados por Villalba-Villalba et al(2013), Khangembam e Chakrabarti (2015), Freitas-Júnior et al (2012), a cromatografia de afinidade foi usada como segunda ou terceira técnica cromatográfica para purificar tripsina.

Na cromatografia de afinidade, a coluna é composta por grupos químicos que se ligam a proteínas específicas, o que torna o método muito seletivo. Quando a amostra é aplicada na coluna, proteínas com afinidade pela coluna ficarão ligadas a ela, enquanto as demais proteínas migraram rápido pela coluna. Com o tampão de eluição é possível reverter à ligação da proteína com a coluna. A eluição pode ser feita de várias formas, entre elas estão: a) alterando as interações da proteína; b) alterando as propriedades do ligante e c) por competição pelo ligante ou pelo alvo (OSTROVE, 1990; GENERAL ELECTRIC COMPANY, 2007).

Figura 9: Representação da cromatografia líquida, sendo a- cromatografia de troca iônica; b- cromatografia de gel filtração e c- cromatografia de afinidade.



Fonte: NELSON e COX, 2014.

2.3.7 Acompanhamento da Purificação

A cada processo de purificação da tripsina há a necessidade de acompanhar cada etapa para assegurar a estabilidade da protease, a eficiência dos processos de purificação e detectar a presença de atividade enzimática relacionada a tripsina. Alguns ensaios quantitativos podem ser realizados para entender e verificar se os processos usados são suficientes para purificar a tripsina e caracterizá-la (BERG et al, 2004; VOET et al, 2006).

2.3.7.1 Eletroforese

A eletroforese é uma técnica usada para estimar a massa molecular de uma proteína em uma mistura e, também, para analisar o perfil enzimático da amostra com relação ao seu grau de purificação. Na eletroforese, as partículas são carregadas eletricamente e migrarão após serem submetidas a um campo elétrico (VOET et al, 2006; NETO e NUNES, 2003).

A migração das proteínas ocorre em um suporte constituído por gel de poliacrilamida. A poliacrilamida formará uma malha porosa, a qual os poros separarão as proteínas pela carga elétrica e massa. Para separar as proteínas apenas pela massa, o detergente dodecil sulfato de sódio (SDS) é adicionado ao gel de poliacrilamida. A função do SDS é configurar uma carga elétrica negativa final a cada proteína, garantindo que as proteínas possuam uma razão carga-massa semelhante e separem, quase exclusivamente, em função da massa molecular. Assim, os poros formados pela poliacrilamida retardará a

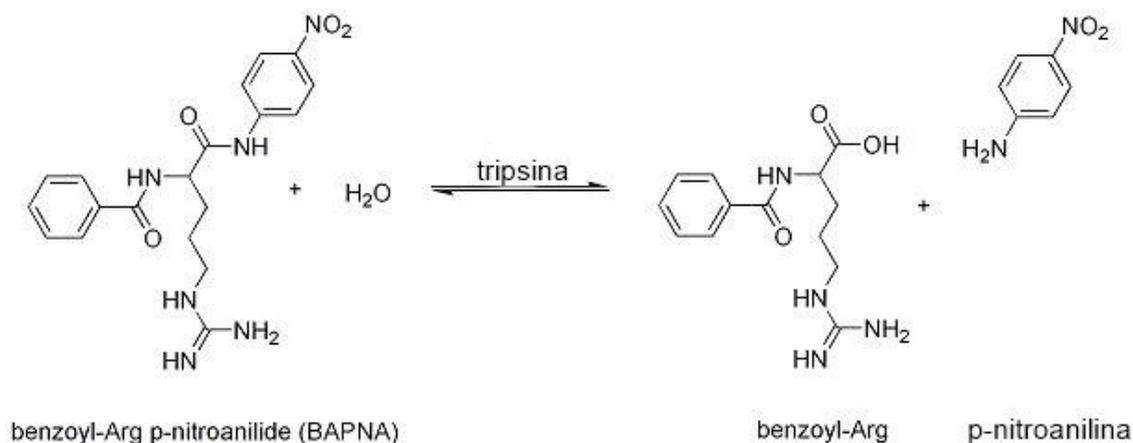
migração das proteínas com massa molecular grande, enquanto as proteínas menores migrarão mais rápido. A técnica que envolve a utilização de poliacrilamida e SDS é conhecida como eletroforese SDS-PAGE (CAMPBELL e FARREL, 2007; VOET et al, 2006; NETO e NUNES, 2003).

Para finalizar é usado um corante como solução reveladora, podendo ser o azul Comassi, para visualizar a disposição das proteínas no gel. O corante liga-se as proteínas e não ao gel, formando banda(s) azul onde tem proteína (VOET et al, 2006).

2.3.7.2 Substratos cromogênicos

Uma das formas para detectar a atividade enzimática da tripsina e a concentração em uma determinada solução são através de substratos cromogênicos, substâncias que absorvem luz na região do visível (VOET et al, 2006). As proteases alcalinas, como a tripsina, possuem um cromóforo específico, o N- α -benzoil-L-arginina-4-nitroanilida (BAPNA). Na presença da tripsina o BAPNA é hidrolisado entre a ligação do resíduo de aminoácido arginina e a p-nitroanilina, Figura 10. A formação de p-nitroanilina pode ser observada visualmente, já que sua liberação resulta em uma coloração amarelada, e através da espectroscopia, pois o produto p-nitroanilina absorve luz a 410 nm (SIGMA-ALDRICH, 2010). Dessa forma, é possível acompanhar tanto a presença de tripsina em uma solução, como também a pureza da enzima em questão.

Figura 10: Hidrólise do substrato cromogênico BAPNA na presença da tripsina.



Fonte: Gatterdam, 2007

7 OBJETIVOS

7.1 Objetivo Geral

Purificar e caracterizar a(s) tripsina(s) da Traíra (*Hoplias malabaricus*).

7.2 Objetivos Específicos

- Realizar fracionamento da proteína de interesse pela precipitação por sulfato de amônia e etanol;
- Isolar a(s) enzima(s) a partir da fração proteica com maior atividade enzimática;
- Avaliar o grau de purificação e massa molecular da proteína isolada por SDS-PAGE;
- Caracterizar a enzima isolada com relação a suas propriedades bioquímicas;
- Determinar parâmetros cinéticos da tripsina purificada.

3 METODOLOGIA

3.1 Coleta do Material

A realização dos experimentos e captura dos animais foram realizadas perante a autorização da Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) com número de protocolo 09/2018 e pelo Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade (SISBio) com número de autorização 63071.

As traíras foram capturadas por pescadores locais em um açude localizado na cidade de Igaci – AL. Com tesoura e bisturi, as vísceras foram retiradas dos animais e guardadas em sacos plástico e, posteriormente, foram congeladas.

3.2 Preparo do Extrato Bruto

Com bisturi, os cecos pilóricos das traíras foram separados das vísceras e preparados dois extratos brutos. Para a preparação do primeiro extrato bruto foram utilizadas 26 traíras, retirados seus cecos pilóricos, pesados (23,18 g), macerados com o auxílio de tesouras e homeneizados com tampão Tris-HCl 50 mM pH 8,0 (tampão de extração) na proporção de 2 g/mL, de acordo com Santos (2018). Para o segundo extrato bruto, o procedimento de homogeneização foi repetido, porém usando 18 cecos pilóricos, que resultaram em massa igual a 28,390 g.

O homogenato foi transferido para tubos de 50 mL e submetido à centrifugação a 15.000 xg por 15 minutos e temperatura igual a 4 °C (Centrifuges Hitachi, série RXII). O sobrenadante resultante após a centrifugação foi coletado e denominado de extrato bruto.

3.3 Determinação da Atividade Enzimática

Após cada procedimento de purificação, foi realizado ensaio enzimático com o substrato cromogênico BApNA (específico para tripsina) a 50 mM em DMSO (dimetilsulfóxido).

Para as reações foram utilizados 10 µL de amostra, 390 µL de tampão e 100 µL de solução reveladora (2 µL de BApNA 50 mM com 98 µL de tampão). A reação foi colocada em Banho Maria (KACIL BM-02) a 37 °C por 30 minutos. Após passar o tempo determinado,

a reação foi retirada do Banho Maria e interrompida com 500 µL de ácido cítrico 20% (m/v), como descrito por Santos (2018). Em seguida, foi realizada a leitura da absorbância a 410 nm no espectrofotômetro UV-Vis.

A atividade de amidase da tripsina, hidrólise do BApNA, foi calculado de acordo com a fórmula abaixo:

$$\text{Atividade (U/mL)} = \frac{(A - A_0) \times \text{volume final da mistura (mL)} \times 1000}{8800 \times \text{tempo de reação (min)} \times 1,0 \text{ mL}}$$

Sendo $8880 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ o coeficiente de extinção para a p-nitroanilina, A e A_0 os valores de absorbância das amostras a 410 m e o branco da reação, respectivamente (SANTOS, 2016).

3.4 Precipitação Salina e com Solvente Orgânico

O fracionamento do extrato bruto foi realizado a partir de dois métodos: precipitação salina e precipitação com solvente orgânico, usando o sulfato de amônia como sal e o etanol como solvente orgânico, como descrito por England e Seifter (1990). Nos dois casos foram realizados cinco ciclos de precipitação em concentrações diferentes (0-20%, 20-40%, 40-60%, 60-80% e 80-100%). A cada ciclo, a adição de sulfato de amônia e etanol a amostra ocorreu sobre agitação constante em banho de gelo. As frações com sal foram incubada por 1 hora a 4 °C e logo em seguida centrifugadas a 15.000 xg por 15 minutos a 4° C. Enquanto, as frações com etanol foram incubadas nas mesmas condições, porém pelo período de 15 minutos. Ao final de cada centrifugação foi formado um precipitado e sobrenadante, no qual o precipitado foi ressuspensionado em 500 µL de tampão Tris-HCl 50 mM pH 8,0, enquanto o sobrenadante foi retirado e usado para os novos ciclos de precipitação. As frações resultantes passaram por teste enzimático com o BApNA como descrito no tópico 3.3.

3.5 Cromatografia por Exclusão Molecular (Gel Filtração)

A cromatografia de exclusão molecular foi realizada com a fração com maior atividade enzimática tanto da precipitação salina, quanto da com solvente orgânico. A resina da coluna utilizada foi Sephacryl S-100 (50 mL e dimensões de 60x1 cm) acoplada ao aparelho ÄKTA Pure M1(GE) que foi equilibrada com tampão Tris-HCl 50 mM pH 8,0 com NaCl 0,5 M pH 8,0 (tampão B). Em seguida foi aplicado 300 µL de cada amostra, previamente centrifugada por 1 minuto, com fluxo de 0,5 mL/min. Foi realizado teste de

atividade enzimática com BApNA nos 40 tubos coletados de cada cromatografia (SOUZA, 2018).

3.6 Eletroforese SDS-PAGE

Para avaliar a pureza das frações obtidas foram executadas eletroforeses em gel de poliacrilamida com dodecil-sulfato de sódio (SDS-PAGE) a 12% (m/v) a voltagem constante (90 V), como descrita por Laemmli (1970). Como tampão das amostras foi usado 0,5 M Tris-HCl pH 6,8; 2% SDS; 10% Glicerol; 5% 2-mercaptoetanol; 0,001% de azul de Bromofenol e aquecido por 10 minutos a 100 °C. Para corar os géis e identificar as bandas foram empregados dois métodos: (1) Coomassie Brilliant Blue G-250 em água, seguido de metanol (1:1) por 2 horas e usando solução descorante (50% metanol, 10% ácido acético e 40% água); (2) 0,4 g de nitrato de prata (AgNO_3) diluída em 2 mL de água deionizada acompanhada da adição da solução B (126 μL de NaOH 10 M + 46,5 mL de água deionizada + 1,250 mL de NH_4OH +), mantendo nesta por 15 min. Em seguida, os géis foram lavados com água e a solução C (25 μL de ácido cítrico + 25 μL de formaldeído + 50 mL de água deionizada).

3.7 Teste de Temperatura Ótima

Ensaio enzimáticos com BApNA em diferentes temperaturas foram realizados para avaliar a temperatura ótima da enzima purificada. Nas reações efetuadas foram adicionados 20 μL da enzima com 380 μL de tampão B e 100 μL de solução reveladora (2 μL de BApNA + 98 μL de tampão B), seguida de incubação por 1 hora em Banho Maria na temperatura entre 20 °C a 70 °C. Com 500 μL de ácido cítrico 20% (m/v) as reações foram encerradas. A atividade da enzima em cada faixa de temperatura foi analisada em espectrofotômetro a 410 nm (SILAS et al, 20120).

3.8 Teste de pH Ótimo

Para determinar o pH ótimo da enzima purificada foram executadas reações entre diferentes faixas de pH (4 à 10). Para a execução tampões em diferentes pH foram preparados, porém com a mesma concentração (100 mM):

- pH 4, 5 e 6: acetato + NaOH;
- pH 7: fosfato monobásico + fosfato bibásico;

- pH 8: tris-HCl;
- pH 9 e 10: glicina + NaOH.

Cada reação tinha 20 μL da enzima, 380 μL de cada tampão e 100 μL de solução reveladora (2 μL de BApNA + 98 de cada tampão) (SILAS et al, 2012).

3.9 Cinética Enzimática

A atividade da enzima purificada foi analisada a partir da curva cinética de Michaelis-Menten. Para tal foram elaboradas reações com diferentes concentrações de BApNA (0,000730; 0,001460; 0,002920; 0,005850; 0,011710; 0,023430; 0,046875; 0,093750; 0,187500; 0,375; 0,75; 1,5; 3,0; 6,0 mM). As reações envolvidas para fazer o estudo continha 20 μL da enzima com 380 μL de tampão (glicina 100 mM + NaOH pH 9,0) e 100 μL de solução reveladora (2 μL de BApNA em cada concentração+ 98 μL de tampão glicina 100 mM + NaOH pH 9,0). As amostras foram incubadas durante 1 hora em Banho Maria a 50 °C e usado 500 μL de ácido cítrico 20% para interromper a reação. Os valores de absorvância obtidos após a análise foram inseridos em um gráfico e os parâmetros cinéticos de Michaelis-Menten (K_M e V_{MAX}) calculados usando o programa GraphPad Prism 7.

3.10 Teste de inibição

Foi realizado teste de atividade enzimática da enzima parcialmente purificada a presença de cinco inibidores. Os inibidores usados foram PMSF (5mM), 2-mercaptoetanol (5 mM), SBTI (1 mM), benzamidina (5 mM) e EDTA (ácido etilenodiamino tetra-acético) (5 mM). A enzima foi incubada com os inibidores a 25 °C por 30 min. Após transcorrer o tempo determinado, foi realizado teste de atividade como o descrito em 3.2. A reação sem a presença de inibidores foi considerada como 100% da atividade (BEZERRA et al, 2011; SANTOS, 2016; SANTOS, 2018)

3. 11 Zimograma

Para o zimograma, a preparação do gel foi realizada como descrito em 3.7. Sendo a única diferença que o gel foi polimerizado com 0,2 % de caseína e o tampão de amostra foi preparado sem a presença de redutor. Após finalizar a eletroforese, o gel foi lavado por 30 minutos com Triton X-200 2,5% e tampão (glicina 100 mM + NaOH pH 9,0) para retirar o

SDS. Em seguida, o gel foi incubado com tampão (glicina 100 mM + NaOH pH 9,0) por 48 h e corado como dito em 3.6.

3.12 Análise estatística

Os dados foram analisados e construídos os gráficos com o auxílio do programa GraphPad Prism 7

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Extrato Bruto

Dois extratos brutos (ExBr1 e ExBr2) foram preparados a partir dos cecos pilóricos da traíra. Os dois extratos apresentaram atividade enzimática em teste com o substrato BApNA, como pode ser observado na tabela 3 pelos valores de atividade enzimática.

Tabela 3: Análise da absorbância do extrato bruto do ceco pilórico da traíra (*H. malabaricus*) no espectrofotômetro a 410 nm.

	Quantidade*	Massa dos cecos pilóricos (g)	Volume de extrato bruto (mL)	A _{410 nm}
ExBr1	26	23,1768	15	0,203
ExBr2	18	28,390	14	0,199

*Número total de traíras capturadas.

Fonte: autor, 2019.

Em um estudo anterior realizado por Alencar et al (2003) com peixes tropicais demonstrou que o ceco pilórico da traíra possuía maior atividade enzimática, quando comparado ao intestino e fígado desse animal. Segundo Alencar et al (2003), a alta atividade apresentada no ceco pilórico possui relação com várias enzimas com atividade proteolítica alcalina. É possível que essa atividade enzimática esteja relacionada a enzima digestiva tripsina, devido a características como agir em meios alcalinos e realizar clivagem proteolítica de outras proteases digestivas.

Outro fato é que o BApNA, na presença de serino proteases forma o produto p-nitroanilina. O produto formado tem como característica a coloração amarelada e absorver luz na faixa de 410 nm. Como pode ser visto na tabela 3, o extrato bruto conseguiu absorver luz nessa faixa, indicando mais uma vez a presença de uma serino protease no ceco pilórico da traíra. Sendo a tripsina uma enzima pertencente ao grupo das serino proteases.

Depois de confirmada a presença de atividade enzimática nos dois extratos brutos, extratos, foi realizada precipitação fracionada para continuar a purificação da tripsina. Para isso, o ExBr1 foi precipitado com etanol e ExBr2 precipitado com sulfato de amônia.

4.2 Precipitação Fracionada

4.2.1 Precipitação com Solvente Orgânico

O ExBr1 foi fracionado usando o etanol como solvente orgânico . As atividades de cada fração podem ser verificadas na tabela 4.

Tabela 4: Atividade enzimática da tripsina nas frações de precipitação com etanol, utilizado o extrato bruto do ceco pilórico da traíra.

Frações	A _{410nm}
B - 0-20%	0,107
C - 20-40%	0,021
D - 40-60%	0,019
E - 60-80%	0,101
F - 80-100%	0,147
G - 100%	0,069

Fonte: autor, 2019.

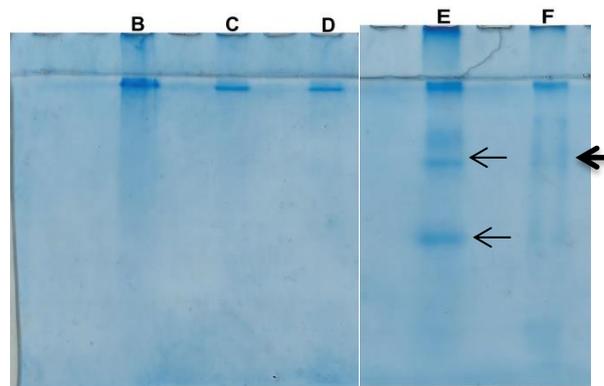
A precipitação fracionada com etanol conseguiu separar as enzimas, concentrar a atividade em três frações (B, E e F), além de retirar contaminantes que poderia está no extrato bruto. A precipitação com etanol mostrou bons resultados com o polissacarídeo hemicelulose (LI et al, 2016), recuperando 55,09% do polissacarídeo original e com a enzima pectinase (TRENTINI et al, 2015), na qual a maior atividade enzimática foi detectada no sobrenadante da amostra precipitada. Em estudo realizado por Michail et al (2006), mostrou a purificação parcial de proteases ácidas e serino proteases da cabeça da truta-arco-íris usando acetona como agente precipitante. Nessa pesquisa, a precipitação com acetona gelada mostrou ter valor de recuperação maior (99%) do que a precipitação com sulfato de amônia (8%), sendo a precipitação com solvente orgânico mais eficiente do que com sal.

A precipitação do ExBr1 com etanol, concentrou a maior atividade na fração F (80-100%), tendo maior valor de absorbância comparada às demais frações. As frações B (0-20%) e E (60-80%) apresentaram valores de absorbância semelhantes. Na eletroforese SDS-PAGE 12%, Figura 11, é possível visualizar o perfil protéico das amostras fracionadas. Para a fração F, foi possível observar duas bandas próximas, o que indica a existência de proteínas com propriedades similares associadas ao maior valor de absorbância quando comparadas as demais frações.

Comparando a fração F com a fração E (60-80%), a segunda maior atividade, é notável que a fração E concentra proteínas com massas moleculares diferentes, uma vez que as bandas estão posicionadas em regiões diferentes do gel. Portanto, pode-se dizer que a purificação da fração E envolveria mais etapas devido a mistura de proteínas com massas moleculares diferentes.

Outro ponto analisado foi à recuperação de atividade após o fracionamento com etanol. A recuperação de atividade é o percentual de atividade mantida após cada etapa da purificação, sendo 100% a atividade do extrato bruto. As três maiores atividades do fracionamento com etanol tiveram recuperação de atividade baixa (B = 8,73%, E = 8,98% e F = 12,67%). Diante disso, foi escolhida a fração F para submeter à cromatografia de exclusão molecular, já que conseguiu concentrar mais a enzima a ser isolada.

Figura 11: Gel de eletroforese SDS-PAGE corado com Comassie Brilliant Blue G-250 das frações resultantes da precipitação com etanol. Sendo B=0-20%, C=20-40%, D=40-60%, E=60-80% e F=80-100%.



Fonte: autor, 2019.

4.2.2 Precipitação Salina

A precipitação salina iniciou a partir do ExBr2 usando o sulfato de amônia como sal e realizando 5 ciclos de fracionamento.

Tabela 5: Valores de absorbância das frações resultantes da precipitação salina do ExBr2.

Frações	A_{410nm}
II - 0-20%	0,061
III - 20-40%	0,393
IV - 40-60%	0,363

V - 60-80%	0,104
VI - 80-100%	0,050

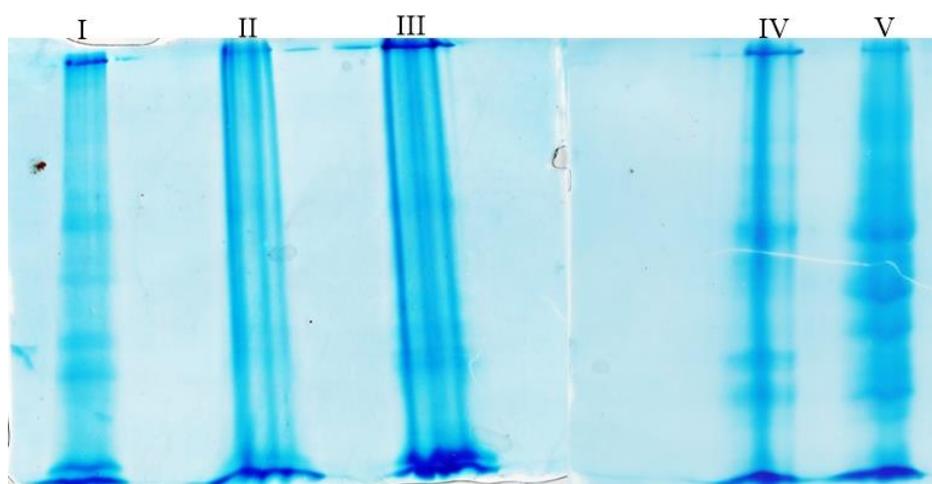
Fonte: autor, 2019.

Observando os valores de absorvância para cada fração na tabela 5, notou-se que a fração III (20-40%) e IV (40-60%) possuem números próximos e elevados de absorvância quando comparadas as demais fração. Desse modo, ficou comprovada a eficácia do método de separação utilizado, uma vez que a atividade detectada ficou concentrada em apenas duas frações. Em alguns estudos envolvendo a precipitação com sulfato de amônia, a atividade concentrava-se apenas na fração 40-60% (SANTOS, 2016; SOUZA, 2018; SANTOS, 2018).

Com relação à recuperação de atividade, as frações III e IV tiveram 30,8% e 28,5% , respectivamente, de atividade enzimática recuperada. Outras pesquisadas relacionadas a purificação de tripsina, empregando a precipitação salina, mostraram valores de recuperação de atividade de 35,4% (FREITAS-JÚNIOR et al, 2012), 34,7% (BEZERRA et al, 2005) e 36,2% (SILVA et al, 2011). Valores próximos a das frações III e IV, demonstrando a eficácia do método empregado e a retenção de parte da atividade enzimática após o fracionamento.

Ainda é possível implicar que há uma concentração de proteases em duas frações e que as tripsinas podem estar presentes em uma delas ou nas duas, Figura 12. Devido a tais aspectos optou-se por levar as duas frações para mais uma etapa de purificação, a cromatografia de gel filtração.

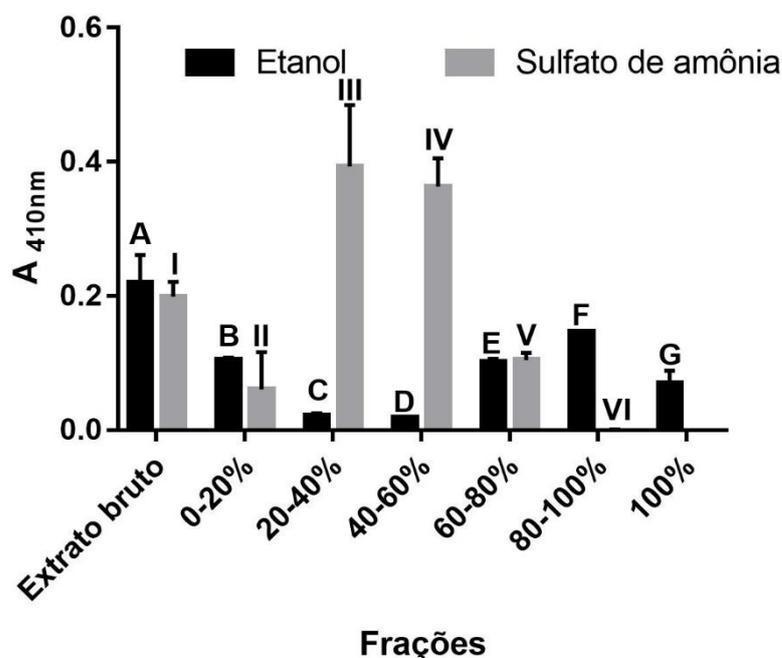
Figura 12: Gel de eletroforese SDS-PAGE corado com Comassie Brilliant Blue G-250 das frações resultantes da precipitação com sulfato de amônia. Sendo I=ExBr2, II=0-20%, III=20-40%, IV=40-60%, V= 60-80%.



Fonte: autor, 2019.

As frações resultantes da precipitação com sal mostrou ter atividade enzimática superior a das frações da precipitação usando etanol, além de apresentar valores de recuperação de atividade maiores. Assim, a precipitação salina mostrou ser mais eficaz do que a precipitação com solvente orgânico, Figura 13. Segundo Scopes (1994), a precipitação com solventes orgânicos requer cuidado com a temperatura, já que pode influencia no resultado final. Portanto, é aconselhado realizar a precipitação em temperaturas abaixo de 10 °C. Em altas temperaturas, pequenas moléculas orgânicas podem entrar pela superfície da proteína e interagir com resíduos internos, provocando a desnaturação da proteína.

Figura 13: Comparação entre os resultados obtidos com a precipitação com solvente orgânico e com sal.



Fonte: autor, 2019.

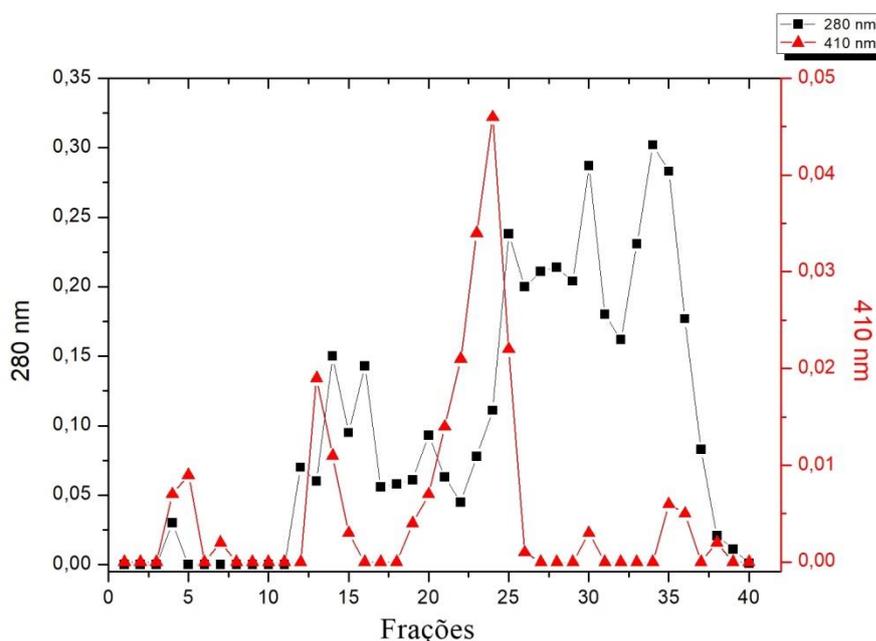
4.3 Cromatografia de Gel Filtração

Tanto a fração F como as frações III e IV foram submetidas a cromatografia de exclusão molecular, com a coluna equilibrada com o tampão (tris-HCl 50 mM + NaCl 50 mM pH 8,0). Em cada corrida da cromatografia líquida foram coletados 40 tubos.

Através da figura 14 é possível notar que a fração F possui um pico de atividade entre os tubos 23,24 e 25, o qual coincide com a visualização de proteínas nessa mesma região, confirmada por leitura a 280 nm. Além disso, ainda foram apresentados mais dois

picos de atividade, totalizando três picos. Tal fato pode está relacionado com a presença de isoformas. Uma das características da tripsina é estar presente nos meios como isoforma, portanto, os três picos de atividade podem estar relacionados as isoformas da tripsina. No trabalho apresentado por Klomklao et al (2007) mostrou a purificação e caracterização de três isoformas da tripsina. As isoformas foram isoladas do Bonito (*Katsuwonus pelamis*) após três etapas de cromatografia (duas gel filtração e uma troca iônica).

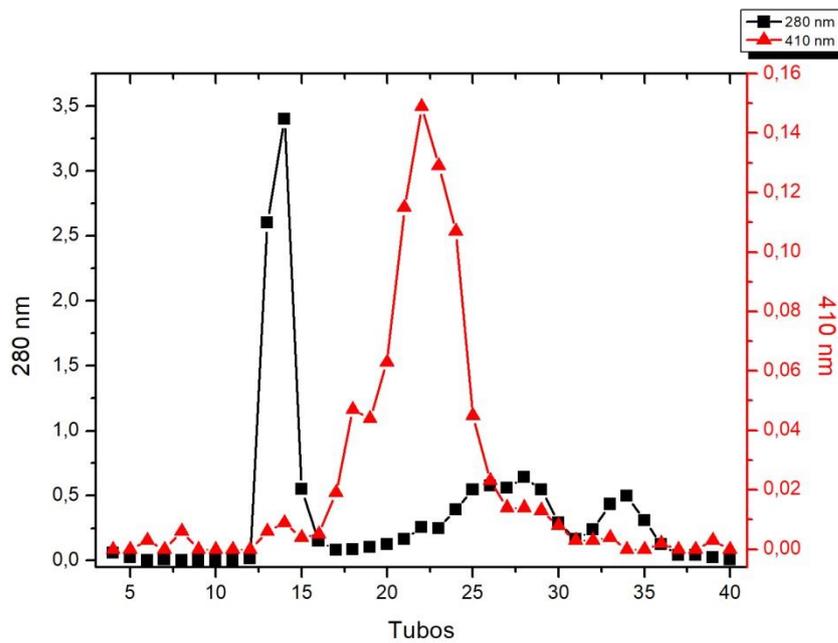
Figura 14: Cromatografia de exclusão molecular com fração F (80-100%) da precipitação com solvente orgânico. Linha preta leitura a 280 nm e linha vermelha a 410 nm.



Fonte: autor, 2019.

Com relação à cromatografia da fração III da precipitação salina, Figura 15, todos os tubos coletados foram submetidos a teste de atividade a partir da hidrólise do BApNA. É perceptível um único pico de atividade na região entre os tubos 21,22 e 23. Na mesma região há absorção de luz a 280 nm com valores próximos. Essa é uma evidência da presença de uma única espécie de proteína que fracionou em tubos diferentes. Dessa forma, pode-se dizer que a tripsina possui atividade específica. Segundo Berg et al (2004) a atividade específica (U/mg) de uma enzima é a razão da atividade enzimática (U) e a quantidade de proteína (mg) na solução e tende a aumentar no decorrer do processo de purificação. Como pode ser visto na figura 14, há uma alta atividade concentrada em uma pequena região com concentração de uma mesma protease, o que configura uma atividade específica para essa tripsina.

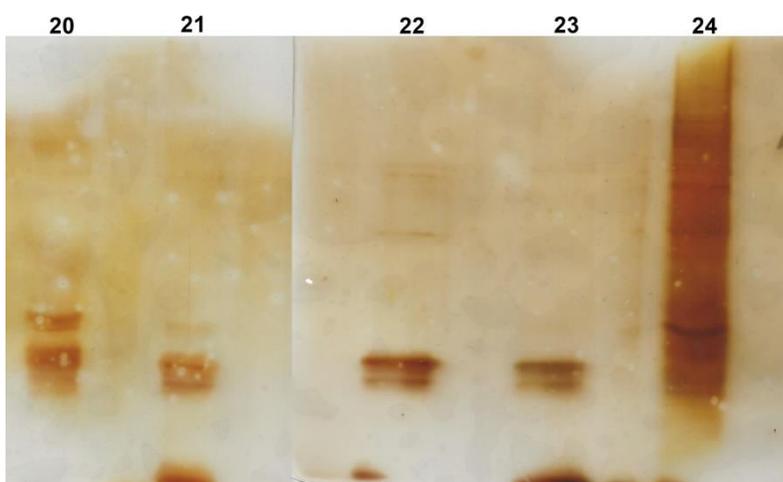
Figura 15: Cromatografia de exclusão molecular com fração III (20-40%) da precipitação com sulfato de amônia. Linha preta leitura a 280 nm e linha vermelha a 410 nm.



Fonte: autor, 2019.

O gel de eletroforese SDS-PAGE 12% dos tubos 21,22 e 23 da cromatografia de exclusão molecular da fração III pode ser visto na figura 16. As canaletas correspondentes dos tubos 21, 22 e 23 apresentaram duas bandas próximas e com mesma altura, mostrando que a tripsina foi parcialmente purificada. Assim afirmando mais uma vez que a atividade observada na hidrólise do BApNA está relacionada a uma única protease. Bezerra et al (2001) também alcançou a purificação parcial da tripsina do tambaqui, na qual obteve recuperação de 40%. A recuperação de atividade dos tubos 21, 22 e 23 totalizaram 33,25%, valor próximo ao encontrado por Bezerra et al (2001) e, também, em estudos de purificação de tripsina com o peixe do gênero *Pterygoplichthys disjunctivus*, 28,6% (VILLALBA-VILLALBA et al, 2013) e o peixe caratinga, 22,1% (SILVA et al, 2011).

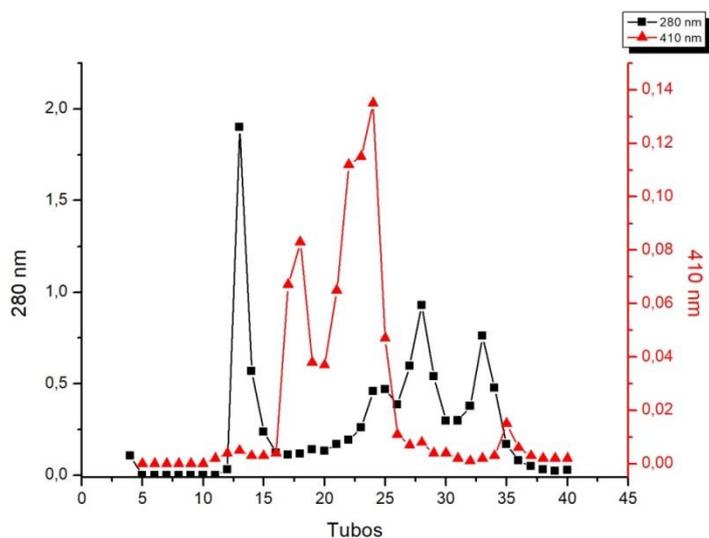
Figura 16: Gel de eletroforese SDS-PAGE 12% corado com nitrato prata dos tubos 20, 21, 22,23 e 24 coletados da cromatografia de exclusão molecular da fração III da precipitação salina.



Fonte: autor, 2019.

Na cromatografia de exclusão molecular da fração IV da precipitação salina, Figura 17, foram observados dois picos de atividade, um entre os tubos 17 e 18 e outro entre os tubos 22,23 e 24. Essa é mais uma evidência da presença de isoformas, assim como foi apresentado na cromatografia da fração F.

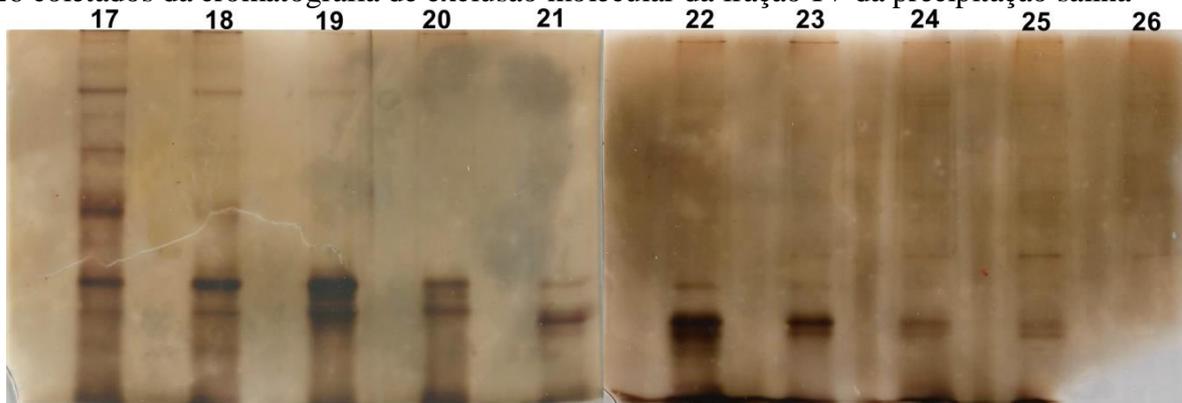
Figura 17: Cromatografia de exclusão molecular com fração IV (40-60%) da precipitação com sulfato de amônia. Linha preta leitura a 280 nm e linha vermelha a 410 nm.



Fonte: autor, 2019.

O gel de eletroforese dos tubos 17 até 26 da cromatografia da fração IV pode ser visto na figura 18. Os tubos correspondentes ao primeiro pico de atividade (17 e 18), mostram várias bandas, ficando evidente a presença de uma mistura de enzimas. Porém, nas canaletas relacionadas ao segundo pico de atividade (22, 23 e 24) apresentaram duas bandas próximas (e na amostra 21 também), indicando a possível purificação parcial da enzima nessas amostras.

Figura 18: Gel de eletroforese SDS-PAGE 12% corado com nitrato prata dos tubos 17 até o 26 coletados da cromatografia de exclusão molecular da fração IV da precipitação salina



Fonte: Autor, 2019.

A partir dos resultados obtidos foi observado na cromatografia das frações F e IV há presença de possíveis isoformas da tripsina, uma vez que nos ensaios com BApNA foi apresentado mais de um pico de atividade com perfil protéico similar no gel de eletroforese SDS-PAGE. No entanto, na cromatografia da fração III foi observada a concentração de atividade em um pico proteico, o que configura uma atividade específica a tripsina presente. Além disso, por meio de eletroforese SDS-PAGE 12% foi confirmada a purificação parcial da tripsina.

Em muitos estudos, a purificação da tripsina acontece em mais de três etapas e usando mais de uma técnica cromatográfica, sendo a cromatografia de gel filtração a primeira escolha na maioria dos casos. Entre esses casos do uso apenas da gel filtração como método cromatográfico para a purificação, pode-se citar as tripsinas purificadas de peixes de água doce das espécies *Oreochromis niloticus* (BEZERRA et al, 2005) e *Diapterus rhombeus* (SILVA, 2011). Outro caso é o de Santos (2016) que conseguiu purificar a tripsina do Pacamã usando apenas a precipitação salina com sulfato de amônia e cromatografia de troca iônica com coluna DEAE-Sepharose. No estudo apresentado por Kano et al (2018) da purificação da tripsina encontrada na traíra, a purificação também ocorreu em dois passos, sendo eles a purificação com sulfato de amônia e a cromatografia por afinidade.

Levando em consideração esses resultados, foi decidido prosseguir com a caracterização da tripsina parcialmente purificada da cromatografia de exclusão molecular da fração III.

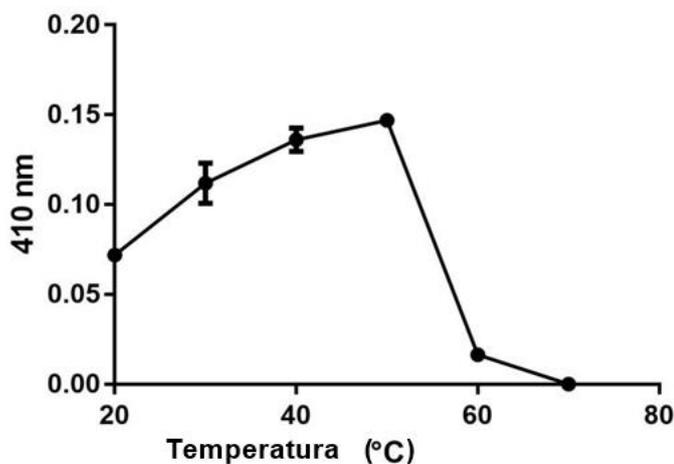
4.4 Caracterização Enzimática

4.4.1 Temperatura Ótima

Cada enzima possui propriedades específicas, assim como possui meios com características próprias para manter sua função. Mudança no ambiente ao qual a proteína estar sendo exposta pode levá-la a desnaturar e, assim perder sua função. Por tanto, é importante saber fatores como pH e temperatura ótima de cada proteína para evitar a desnaturação (VOET, 2006). Outro ponto importante é que os fatores citados possuem influência sobre a futura aplicação da enzima, tornando ainda mais relevante estudar essas características.

Na figura 19, pode ser visto o comportamento da tripsina do ceco pilórico da traíra frente à variação de temperatura. À medida que a temperatura aumenta, a atividade enzimática também aumentava, na qual a atividade enzimática foi mantida entre 30-50 °C, atingindo o maior valor a 50 °C, sendo essa temperatura considerada ótima. De forma geral, proteínas desnaturam e perdem totalmente sua atividade em temperaturas elevadas, assim explicando a perda de atividade brusca da tripsina quando a temperatura aumentou. Estudos realizados com *Lophiosilurus alexandri* (SANTOS, 2016), *Diapterus rhombeus* (SILVA et al, 2011), *Oreochromis niloticus* (BEZERRA et al, 2005) também apontam 50 °C como a temperatura ótima da tripsina isolada. Em alguns trabalhos, a temperatura ótima encontrada para a tripsina foi abaixo do que é observado geralmente, uma dessas pesquisas é a de Villalba-Villalba et al (2013) e Lu et al (2008), em que apresentaram temperaturas ótimas de 40 °C e 35-40 °C, respectivamente. Indústrias como a de detergentes e de alimentos possuem preferência por enzimas que possuam atividade em temperaturas em torno de 50-60 °C, dessa forma, a tripsina parcialmente purificada possui potencial para ser aplicada nesses segmentos industriais.

Figura 19: Análise de temperatura ótima para a tripsina do ceco pilórico da traíra.



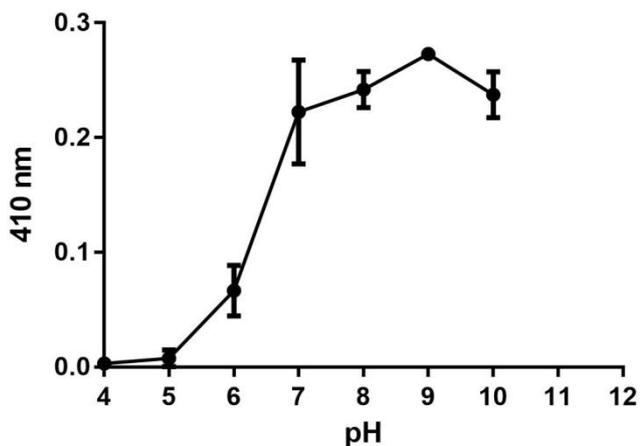
Fonte: autor, 2019.

4.4.2 pH Ótimo

O comportamento da tripsina parcialmente purificada diante da variação de pH pode ser visto na figura 20. Foi observado que quanto mais alcalino o meio, maior era a atividade da tripsina. Entre o pH 7,0 a 10,0, a tripsina isolada apresentou atividade enzimática, sendo o pH 9,0 identificado como ótimo para a protease isolada. Tornando-se interessante sua aplicação na indústria de detergente ou couro, já que são segmentos do mercado industrial que utilizam proteases alcalinas.

Em pH ácido, a atividade enzimática da tripsina era baixa ou nula. A tripsina é uma protease alcalina e consegue manter sua atividade em meio alcalino, sendo que em pH extremos (abaixo de 7 e acima de 10) perde sua função (SIMPSON e HAARD, 1987). Em meio ácido, a atividade enzimática da tripsina diminui, pois eles influenciam a distribuição de cargas e muda a conformação da enzima, fazendo com que a tripsina não consiga se ligar ao substrato. Além disso, o resíduo de His torna-se protonado, impossibilitando o ataque nucleofílico ao grupo –OH da Ser da tríade catalítica (BENJAKUL e MORRISEY, 1997). Resultados semelhantes foram encontrados em tripsinas isoladas das espécies de peixes *Lophiosilurus alexandri* (SANTOS et al, 2016), *Arapaima gigas* (FREITAS-JÚNIOR et al, 2012), *Oreochromis niloticus x O.aureus* (WANG et al, 2010).

Figura 20: Análise do pH ótimo para a tripsina do ceco pilórico da traíra.



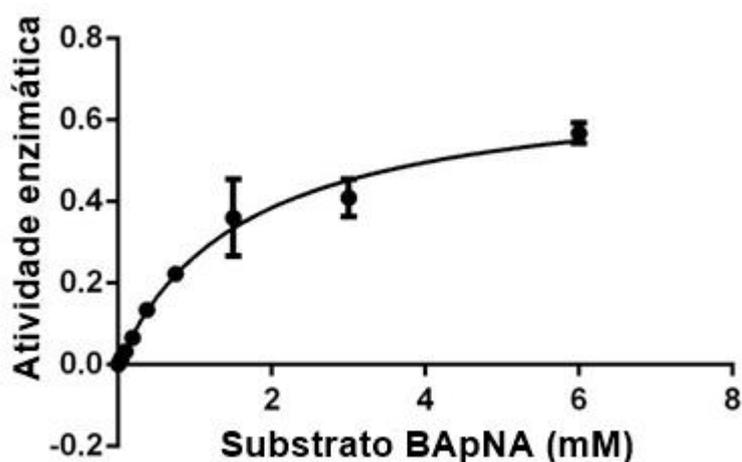
Fonte: autor, 2019.

4.4.3 Cinética Enzimática

As enzimas são descritas como macromoléculas capazes de catalisar reações em meios biológicos. Compreender a velocidade que uma dada enzima converte o substrato em produto é uma forma de avaliar a sua eficiência. Um dos parâmetros usados para entender a cinética de uma reação enzimática é através da constante de Michaelis-Menten (K_M), sendo o valor único para cada enzima. No K_M , a velocidade da reação enzimática é considerada em função da concentração do substrato, assim, K_M é a concentração de substrato em que a velocidade da reação é à metade da velocidade máxima. Dessa forma, valores pequenos de K_M significa a máxima eficiência catalítica da enzima em baixas concentrações de substrato (NELSON e COX, 2014; VOET et al, 2006).

Na figura 21 está representada a curva para da K_M da tripsina isolada, na qual a concentração do substrato BApNA foi variada.

Figura 21: Gráfico de Michaelis-Menten para a tripsina parcialmente purificada do *H. malabaricus* em diferentes concentração de BApNA.



Fonte: autor, 2019.

O valor de K_M deu igual a 1,62 mM e $V_{max} = 0,69 \text{ mM s}^{-1}$. Um valor alto de K_M é considerado ruim quando comparado a demais tripsinas isoladas de peixes de água doce. A comparação de alguns valores de K_M pode ser vista na tabela 6. No entanto, a tripsina isolada ainda pode ser empregada na indústria devido ao seu conjunto de características (temperatura e pH) ser distinto das demais tripsinas isoladas de peixes.

Tabela 6: Tabela contendo diferentes valores de K_m encontrados em diferentes trabalhos de isolamento de tripsinas.

K_m (mM)	Espécie	Referências
1, 62	<i>H. malabaricus</i>	Presente estudo
0,517	<i>L. alexandri</i>	Santos (2016)
0,6	<i>B. callensis</i>	Sila et al. (2012)
0,266	<i>D. rhombeus</i>	Silva et al (2011)
0,47	<i>A. gigas</i>	Freitas-Júnior et al (2012)
0,11-0,29	<i>K. pelamis</i>	Klomklao et al (2007)
0,755	<i>O. niloticus</i>	Bezerra et al (2005)
0,13	<i>P. disjunctivus</i>	Villalba-Villalba (2013)

Fonte: Autor, 2019.

4.4.4 Teste de inibição

Algumas enzimas têm sua atividade enzimática inibida por determinados compostos, A inibição pode fornecer informações importante a respeito das características da enzima

inibida. O inibidor age impedindo a ação da enzima e diminuindo a velocidade de reação (CAMPBELL e FARREL, 2007). A tripsina possui inibidores específicos como PMSF e benzamidina, inibidores de serinoproteases, e o SBTI, inibidor da tripsina da soja. Alguns grupos das endopeptidases possuem inibidores específicos como as metaloproteases que são sensíveis a EDTA e o 2-mercaptoetanol que é um inibidor de cisteína proteases (SUMANTHA, A. et al).

Nos testes de inibição realizados, Tabela 7, a atividade enzimática da tripsina isolada foi reduzida na presença dos inibidores benzamidina, PMSF e SBTI, que são inibidores específicos para serino proteases, o grupo das proteases a qual a tripsina pertence, e o inibidor da tripsina. Estudos de purificação de tripsina de peixes, BEZERRA et al (2011), FREITAS-JÚNIOR et al (2012) e SILAS et al (2012), mostram valores de atividade enzimática maiores, entre 5-30% de atividade residual, mesmo na presença dos inibidores específicos para serino proteases e a tripsina. Diante dos resultados obtidos, pode-se dizer que a protease isolada é possivelmente uma tripsina.

Já na presença do 2-mercaptoetanol, a inibição de atividade foi mínima, mostrando a presença baixa de resíduos de cisteína. O EDTA inibiu 40% da atividade enzimática evidenciando a presença de íons metálicos.

Tabela 7: Inibidores utilizados frente a tripsina isolada do ceco pilórico da traíra.

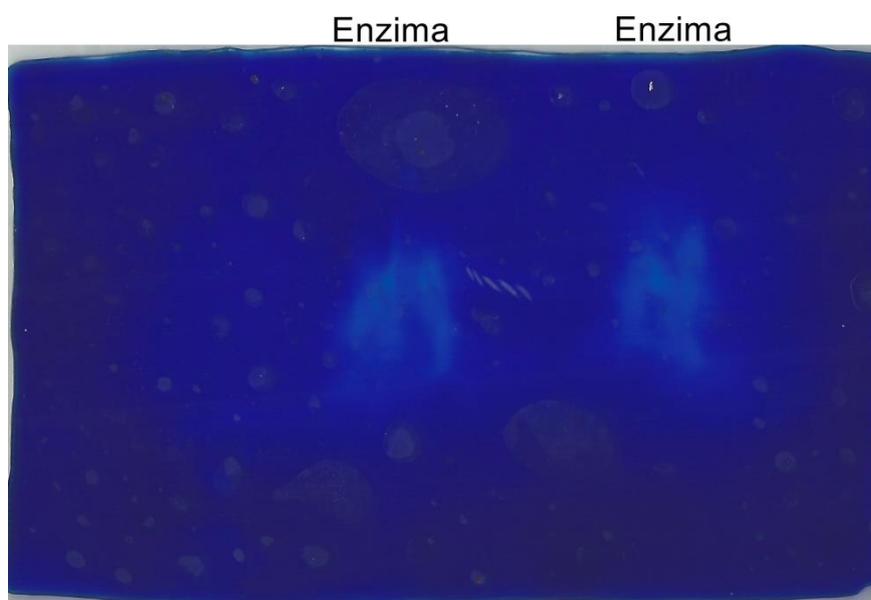
Inibidores	Concentrações (mM)	Atividade residual (%)
EDTA	1	60
2-mercaptoetanol	5	96,8
Benzamidina	5	5,26
SBTI	1	5,96
PMSF	5	1,05

Fonte: Autor, 2019.

4.4.5 Zimograma

O zimograma permite avaliar a atividade enzimática da tripsina isolada em um gel de eletroforese SDS-PAGE, na qual o gel é polimerizado com caseína 0,2%. O gel de eletroforese possui em sua composição moléculas da proteína caseína que é hidrolisada na presença de tripsina. No zimograma, Figura 22, foram aplicadas em duas canaletas a tripsina isolada do ceco pilórico da traíra. Após a coloração do gel, foram detectadas duas bandas mais claras, mostrando, assim, a hidrólise da caseína pela tripsina. Dessa forma, demonstrando mais uma vez a protease isolada trata-se de uma tripsina.

Figura 22: Zimograma com caseína 0,2% polimerizada em gel de eletroforese.



Fonte: Autor, 2019.

5 CONCLUSÃO

Foi possível a purificação parcial da tripsina do ceco pilórico da traíra (*Hoplias malabaricus*) a partir de duas técnicas de purificação. Assim como, foi evidenciado que precipitação salina é mais eficaz para a purificação de tripsina(s) da *Hoplias malabaricus*, apresentando resultados melhores comparados com a precipitação com solvente orgânico. A tripsina parcialmente purificada da *Hoplias malabaricus* possui alta atividade enzimática em pH 9,0 e temperatura em 50 °C , podendo ser empregada na indústria de detergentes ou couro. Também foi confirmado, pelos testes de inibição e o zimograma, que a protease é uma serinoprotease. Apesar de possuir valor de K_M 1,62 mM, a tripsina ainda se mostra promissora por apresentar boa atividade em condições distintas da(s) tripsina(s) já isoladas de peixes e ainda ser ativa mesmo quando imobilizada (zimografia).

REFERÊNCIAS

- ALENCAR, R. B. et al. Alkaline proteases from the digestive tract of four tropical fishes. **Brazilian Journal of Food Technology**, v. 6, n. 2, p. 279-284, 2003.
- AMORIM, D. S.; PIRES, M. R. S. Neotropical biogeography and a method for maximum biodiversity estimation. In: BICUDO, C. E. M.; MENEZES, N. A. **Biodiversity in Brazil: a first approach: proceedings**. São Paulo: CNPq, 1996. p. 183-219.
- ANWAR, A.; SALEEMUDDIN, M. Alkaline proteases: A review. **Bioresource Technology**, v. 64, n. 3, p. 175–183, jun. 1998.
- BENJAKUL, S.; MORRISSEY, M. T. Protein Hydrolysates from Pacific Whiting Solid Wastes. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 45, n. 9, p. 3423–3430, set. 1997.
- BERG, J.M. et al. **Bioquímica**. 5. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan S.A., 2004.
- BEZERRA, R. S. et al. Alkaline proteinase from intestine of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). **Process Biochemistry**, v. 40, n. 5, p. 1829–1834, abr. 2005.
- BLANCO, M. et al. Towards sustainable and efficient use of fishery resources: present and future trends. **Trends in Food Science & Technology**, v. 18, n. 1, p. 29–36, jan. 2007.
- BOUGATEF, A. Trypsins from fish processing waste: characteristics and biotechnological applications – comprehensive review. **Journal of Cleaner Production**, v. 57, p. 257–265, out. 2013.
- CAMPBELL, M. K.; FARREL, S. O. *Bioquímica básica*. 5. ed. Tradução All Tasks. São Paulo: Thomson Learning, 2007.
- CHONG, A. et al. Characterization of digestive enzymes in a carnivorous ornamental fish, the Asian bony tongue *Scleropages formosus* (Osteoglossidae). **Aquaculture**, v. 233, p. 305-320, 2004.
- CHONG, A. et al. Partial characterization and activities of proteases from the digestive tract of discus fish (*Symphysodon aequifasciata*). **Aquaculture**, v. 203, p. 321-333, 2002.
- CONN, E. E. ; STUMPF, P. K. **Introdução à bioquímica**. 4. ed. São Paulo: Blucher, 1980.
- ENGLARD, S.; SEIFTER, S. Precipitation techniques. In: DEUTSCHER, M. P (ED). **Methods in Enzymology | Guide to Protein Purification**. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/bookseries/methods-in-enzymology/vol/182>>. Acesso em: 10 dez. 2018. p. 285-300.
- ESHEL, A. et al. Comparative study of proteolytic enzymes in the digestive tracts of the european sea bass and hybrid striped bass reared in freshwater. **Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Physiology**, v. 106, n. 4, p. 627–634, dez. 1993.

FREITAS-JÚNIOR, A. C. V. et al. Giant Amazonian fish pirarucu (*Arapaima gigas*): Its viscera as a source of thermostable trypsin. **Food Chemistry**, v. 133, n. 4, p. 1596–1602, ago. 2012.

GATTERDAM, V. BAPNA assay zur Aktivitätsbestimmung von trypsin. 2007.

GENERAL ELECTRIC COMPANY (ED). **Affinity Chromatography: principles and Methods**. Uppsala: GE Healthcare Bio-Sciences AB, 2007.

GENERAL ELECTRIC COMPANY (ED). **Gel filtration: principles and methods**. Uppsala: GE Healthcare Bio-Sciences AB, 2010.

GENERAL ELECTRIC COMPANY (ED). **Ion Exchange Chromatography: principles and Methods**. Uppsala: GE Healthcare Bio-Sciences AB, 2016.

GRANNER, D.K. Tópicos especiais: nutrição, digestão e absorção. In: MURRAY. R. K. et al. **Harper: bioquímica ilustrada**. 26. ed. São Paulo: Atheneu editora, 2006.

GRAPHPAD PRISM versão 7. San Diego: GraphPad Software. Acesso em: 10 jan. 2018.

GURUMALLESH, P. et al. A systematic reconsideration on proteases. **Internacional jornal of biological macromolecules**, v. 128, p. 254-267, 2019.

IBGE – INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. **Produção da pecuária municipal**. Rio de Janeiro: IBGE, 2015, v. 43, p. 1-49.

KHANGEMBAM, B. K.; CHAKRABARTI, R. Trypsin from the digestive system of carp *Cirrhinus mrigala*: purification, characterization and its potential application. **Food chemistry**, v. 175, p. 386-394, 2015.

KLOMKLAO, S. et al. Purification and characterisation of trypsin from the spleen of skipjack tuna (*Katsuwonus pelamis*). **Food Chemistry**, v. 100, n. 4, p. 1580–1589, jan. 2007

Kona, R. S. et al. Purificação de uma protease das víceras de traíra (*Hoplias malabaricus*): uso potencial em detergentes. In: XXII CONGRESSO BRASILEIRO DE ENGENHARIA QUÍMICA e XVII ENCONTRO BRASILEIRO SOBRE O ENSINO DE ENGENHARIA QUÍMICA, São Paulo. Resumo expandido. São Paulo: COBEQ e ENBEQ, 2018.

LAEMMLI, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, v. 227, p. 680-685, 1970.

LEIROS, H.-K. S. Trypsin specificity as elucidated by LIE calculations, X-ray structures, and association constant measurements. **Protein Science**, v. 13, n. 4, p. 1056–1070, 1 abr. 2004.

LI, H. et al. Effect of structural characteristics of corncob hemicelluloses fractionated by graded ethanol precipitation on furfural production. **Carbohydrate Polymers**, v. 136, p. 203-209, 2016.

LI, Q. et al. Commercial proteases: present and future. **FEBS Letters**, v. 587, p. 1156–1163, 11 jan. 2013.

LIMA, M.C.B.C. et al. Biologia reprodutiva do peixe Traíra, *Hoplias malabaricus* (Bloch, 1794) (Characiformes: Erythrinidae) no açude Marechal Dutra, Rio Grande do Norte, Brasil. **Biotina Amazônica**, v. 7, n. 2, p. 21-25, 19 jun. 2017.

LU, B. et al. Purification and characterization of trypsins from the pyloric caeca of mandarin fish (*Siniperca chuatsi*). **Food chemistry**, v.110, p. 352-360, 2008.

MARCUSCHI, M. **Purificação e caracterização de uma tripsina do peixe amazônico tambaqui (*Colossoma macropomum*)**. Dissertação (Mestrado em Bioquímica e Fisiologia) Universidade Federal de Pernambuco, PE, 2010.

MARTINS, J. M. E. **Biologia de *Hoplias Malabaricus* (Bloch, 1794) (Characiformes, Erythrinidae) na represa de Capim Branco I, Rio Araguari, MG**. Dissertação (Mestrado em Ecologia e Conservação dos Recursos Naturais) Universidade Federal de Uberlândia, MG, 2009.

MICHAIL, M. et al. Partial purification and comparison of precipitation techniques of proteolytic enzymes from trout (*Salmo gairdnerii*) heads. **Food chemistry**, v. 97, p. 50-55, 2006.

NELSON, D. L.; COX, M. L. **Princípios de Bioquímica de Lehninger**. 6 .ed. tradução: Ana Beatriz Gorini da Veiga et al. Porto Alegre: Artmed, 2014.

NEURATH, H.; WALSH, K. A. Role of proteolytic enzymes in biological regulation. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 73, n. 11, p. 3825-3832, nov. 1976.

OLIVEIRA, V. M. et al. Hidrolases digestivas de peixes: aspectos bioquímicos, fisiológicos e biotecnológicos. **Revista Eletrônica de Biologia (REB)**. ISSN 1983-7682, v. 7, n. 3, p. 330–341, 7 out. 2014.

OLSEN, H. S. **Enzymes at work**. Krogshoejvej: Novozymes, 2004.

OSTROVE, S. Affinity chromatography: general methods In: DEUTSCHER, M. P (ED). **Methods in Enzymology | Guide to Protein Purification**. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/bookseries/methods-in-enzymology/vol/182>>. Acesso em: 10 dez. 2018. p. 357-371

PESSOA, E. K. R. et al. Morfologia Comparativa do Trato Digestório dos Peixes *Hoplias malabaricus* e *Hypostomus puarum* do Açude Marechal Dutra, Rio Grande do Norte, Brasil. **Biota Amazônia**, v. 3, n. 1, p. 48–57, 30 jun. 2013.

RAO, M. B. et al. Molecular and Biotechnological Aspects of Microbial Proteases. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 62, n. 3, p. 597–635, set. 1998.

RAWLINGS, N. D. et al. An introduction to peptidases and the merops Database In: POLAINA, J. (ED.). **Industrial enzymes: structure, function and applications**. Dordrecht: Springer, 2007. p. 161-179.

REECE, J. B. **Biologia de Campbell**. 10. ed. Porto Alegre: Artmed, 2015.

REIS, D. T. C. **Purificação e caracterização de proteases digestivas tripsina-like do intestino de lagarta da soja, envolvidas no mecanismo de interação planta-inseto.** Dissertação (Mestrado em Bioquímica Agrícola) Universidade Federal de Viçosa, MG, 2009.

RODEWELL, V. W.; KENNELLY, P.J. Enzimas: mecanismo de ação. In: MURRAY. R. K. et al. **Harper: bioquímica ilustrada.** 26. ed. São Paulo: Atheneu editora, 2006.

ROSSOMANDO, E.F. Ion-exchange chromatography. In: DEUTSCHER, M. P (ED). **Methods in Enzymology | Guide to Protein Purification.** Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/bookseries/methods-in-enzymology/vol/182>>. Acesso em: 10 dez. 2018. p. 309-317.

ROTTA, M. A. Aspectos gerais da fisiologia e estrutura do sistema digestivo dos peixes relacionados à piscicultura. 1. ed. Mato Grosso do Sul: Embrapa Patanal, 2003.

SANTOS, C. W. V. **Purificação e caracterização de tripsina a partir do ceco-pilórico do pacamã (*Lophiosilurus alexandri*).** Dissertação (Mestrado em Química e Biotecnologia) Universidade Federal de Alagoas, AL, 2016.

SANTOS, U. **Filogeografia de Traíras *Hoplias malabaricus* (Bloch, 1794) (Teleostei, Erythrinidae) das bacias hidrográficas da América do Sul.** Tese (Doutorado em Genética e Melhoramento) Universidade Federal de Viçosa, MG, 16 jul. 2013.

SCOPES, R. K. **Protein purification: principles and practice.** 3. ed. New York: Spriger-Verlag, 1994.

SIGMA (ED). **Na-Benzoyl-D,L-arginine 4-nitroanilide hydrochloride.** Missouri: Sigma – Aldrich, 2010.

SILA, A. et al. Characterisation of trypsin purified from the viscera of Tunisian barbel (*Barbus callensis*) and its application for recovery of carotenoproteins from shrimp wastes. **Food Chemistry**, v. 132, p. 1287-1295, 2012.

SILVA, J. F. et al. Purification and partial characterisation of a trypsin from the processing waste of the silver mojarra (*Diapterus rhombeus*). **Food Chemistry**, v. 129, n. 3, p. 777–782, dez. 2011.

SIMPSON, B. K.; HAARD, N. F. Trypsin and a trypsin-like enzyme from the stomachless cunner. Catalytic and other physical characteristics. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 35, n. 5, p. 652–656, set. 1987.

STELLWAGEN, E. Gel filtration. In: DEUTSCHER, M. P (ED). **Methods in Enzymology | Guide to Protein Purification.** Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/bookseries/methods-in-enzymology/vol/182>>. Acesso em: 10 dez. 2018. p. 317-328.

SUMANTHA, A. et al. Microbiology and industrial biotechnology of food-grade proteases: A perspective. **Food Technol. Biotechnol**, v. 44, n. 2, p. 211-220, 2006.

TRENTINI, M. M. et al. Purification of pectinases from *Aspergillus niger* ATCC9642 by ethanol precipitation. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 4, p. 315-320, 2015.

VILLALBA-VILLALBA, A. G. et al. Trypsin from viscera of vermiculated sailfin catfish, *Pterygoplichthys disjunctivus*, Weber, 1991: Its purification and characterization. **Food Chemistry**, v. 141, n. 2, p. 940–945, nov. 2013.

VOET, D. et al. **Fundamentos de bioquímica: a vida em nível molecular**. 2. ed. Porto Alegre: Artmed editora S.A., 2006.

WANG, Q. et al. Purification and Characterization of Trypsin from the Intestine of Hybrid Tilapia (*Oreochromis niloticus* × *O.aureus*). **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 58, n. 1, p. 655–659, 13 jan. 2010.

WATANABE, O. E. **Estudo da precipitação de tripsina com uso de sais voláteis**. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) Faculdade de Engenharia Química da Universidade Estadual de Campinas, SP, 2004.

YANG, Y. et al. Serine Proteases of Parasitic Helminths. **The Korean Journal of Parasitology**, v. 53, n. 1, p. 1–11, 27 fev. 2015.