

Impl.

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS  
FUNDAÇÃO UNIVERSIDADE DE RIO GRANDE

CONTRIBUIÇÃO AO ESTUDO DAS ENZIMAS PROTEOLÍTICAS DA  
CORVINA (Micropogon furnieri)

Isabel Maria do Amaral Ribas  
Bel. em Ciências Domésticas

Orientador:

Prof. Dr. Juan Alberto Coch Frugoni

Tese apresentada à Faculdade de Engenharia de Alimentos e Agrícola da Universidade Estadual de Campinas para obtenção do título de Mestre em Tecnologia de Alimentos-Área de Pescado.

- 1978 -

UNICAMP  
BIBLIOTECA CENTRAL

A meu esposo

UBIRAJARA

e filhos

FÁBIO

HEITOR

ARTUR

A meu esposo

UBIRAJARA

e filhos

FÁBIO

HEITOR

ARTUR

### AGRADECIMENTOS

Ao Dr. Juan Alberto Coch Frugoni, por sua orientação.

Ao Prof. Vladimir Pezoa Gutierrez, por sua valiosa ajuda durante todo o trabalho.

A Prof<sup>a</sup> Myriam Salas Mellado, pelo apoio amigo.

A Fundação Universidade de Rio Grande, em especial ao Departamento de Química - Laboratório de Bioquímica, onde se realizaram os ensaios.

A Universidade Federal de Pelotas e Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul, pelo suporte financeiro.

As firmas Industriais de Pesca WIGG S.A., Isa-Peixe e Ballester, pelo fornecimento de matéria-prima e pela possibilidade de uso de suas plantas.

## SUMÁRIO

|                                                                        | Página |
|------------------------------------------------------------------------|--------|
| RELAÇÃO DE ILUSTRAÇÕES.....                                            | vi     |
| RELAÇÃO DE TABELAS.....                                                | ix     |
| SINOPSE.....                                                           | x      |
| SUMMARY.....                                                           | xii    |
| <br>1 - INTRODUÇÃO.....                                                | <br>1  |
| 2 - ABREVIATURAS E CONCEITOS.....                                      | 5      |
| 3 - REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....                                         | 7      |
| 3.1 - Aparelho digestivo do peixe.....                                 | 7      |
| 3.2 - Generalidades sobre a espécie <u>Micropterus furnieri</u> .....  | 8      |
| 3.3 - Principais proteases do aparelho digestivo.....                  | 9      |
| 3.3.1 - Endopeptidases.....                                            | 11     |
| 3.3.1.1 - Tripsina.....                                                | 11     |
| 3.3.1.2 - Quinotripsina.....                                           | 13     |
| 3.3.1.3 - Pepsina.....                                                 | 14     |
| 3.3.2 - Aminopeptidases.....                                           | 15     |
| 3.3.3 - Carboxipeptidases.....                                         | 16     |
| 3.3.4 - Enzimas proteolíticas endocelulares.....                       | 17     |
| 3.4 - Efeito do pH na atividade enzimática.....                        | 22     |
| 3.5 - Efeito da temperatura na atividade enzimática.....               | 23     |
| 4 - MATERIAL E MÉTODOS.....                                            | 25     |
| 4.1 - Preparo do substrato.....                                        | 25     |
| 4.2 - Preparo dos extratos enzimáticos.....                            | 25     |
| 4.2.1 - Obtenção das vísceras.....                                     | 25     |
| 4.2.2 - Preparo dos extratos.....                                      | 26     |
| 4.3 - Reações enzimáticas.....                                         | 26     |
| 4.4 - Etapas preparatórias para avaliação da atividade enzimática..... | 27     |
| 4.5 - Avaliação da atividade enzimática.....                           | 28     |
| 4.6 - Composição química da polpa e dos extratos.....                  | 28     |
| 4.7 - Peso molecular dos hidrolisados.....                             | 28     |

|                                                                                                                          | Página |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------|
| 4.8 - Material.....                                                                                                      | 30     |
| 4.8.1 - Equipamentos.....                                                                                                | 30     |
| 4.8.2 - Produtos.....                                                                                                    | 30     |
| 5 - RESULTADOS, DISCUSSÃO E CONCLUSÕES.....                                                                              | 31     |
| 5.1 - Provas da existência da atividade enzimática proteolítica.....                                                     | 31     |
| 5.1.1 - Por determinação do peso molecular dos hidrolisados.....                                                         | 31     |
| 5.1.2 - Por comparação com a atividade proteolítica da tripsina comercial.....                                           | 33     |
| 5.1.3 - Por comparação com a atividade proteolítica do músculo.....                                                      | 34     |
| 5.2 - Influência do pH a temperatura constante.....                                                                      | 36     |
| 5.3 - Influência da temperatura a pH constante.....                                                                      | 39     |
| 5.4 - Comparação entre a atividade proteolítica de vísceras da corvina e a soma da atividade dos órgãos componentes..... | 43     |
| 5.5 - Composição química do músculo comestível e das vísceras da corvina.....                                            | 44     |
| 6 - BIBLIOGRAFIA CITADA.....                                                                                             | 64     |

## RELAÇÃO DE ILUSTRAÇÕES

|                                                                                                                            | Página |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------|
| Figura 1 - Corvina ( <u>Micropogon furnieri</u> ): representação esquemática da forma do corpo e estrutura dos órgãos..... | 8      |
| Figura 2 - Ativação do tripsinógeno, seg. López e Hawk....                                                                 | 11     |
| Figura 3 - Ativação do tripsinógeno, seg. Karlson.....                                                                     | 12     |
| Figura 4 - Mecanismo da degradação da proteína do tecido muscular dos mamíferos.....                                       | 18     |
| Figura 5 - Fluxograma da hidrólise de polpa de corvina pelo extrato de vísceras do mesmo peixe.....                        | 26     |
| Figura 6 - Reator enzimático.....                                                                                          | 27     |
| Figura 7 - Fluxograma da avaliação da atividade enzimática pelo método de Lowry.....                                       | 27     |
| Figura 8 - Curva padrão de tirosina (método de Lowry), Spectromon 360 ajustado pelo branco de reagentes.....               | 45     |
| Figura 9 - Fluxograma da determinação do peso molecular dos hidrolisados de albumina bovina pelas vísceras da corvina..... | 29     |
| Figura 10 - Estudo cromatográfico do hidrolisado de albumina bovina pelo estômago da corvina.....                          | 46     |
| Figura 11 - Estudo cromatográfico do hidrolisado de albumina por extratos de vísceras da corvina.....                      | 47     |

|                                                                                                                                                                 | Página |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------|
| Figura 12 - Estudo cromatográfico do hidrolisado de albumina bovina pelo estômago, seguido por hidrólise por intestino, fígado e ceco pilórico.....             | 48     |
| Figura 13 - Comparação entre a atividade proteolítica das vísceras e da polpa de corvina.....                                                                   | 49     |
| Figura 14 - Atividade enzimática dos extratos do estômago, do intestino, do fígado e do ceco pilórico da corvina nos valores de pH e de temperatura ótimos..... | 50     |
| Figura 15 - Comparação entre a atividade proteolítica do extrato do extômago e a autólise experimentada pelo extrato nas mesmas condições.....                  | 51     |
| Figura 16 - Comparação entre a atividade proteolítica do extrato do intestino da corvina e a autólise experimentada pelo extrato nas mesmas condições.....      | 52     |
| Figura 17 - Influência do pH na atividade enzimática do extrato de vísceras.....                                                                                | 53     |
| Figura 18 - Comparação entre a atividade proteolítica das vísceras de corvina de pesca industrial e de pesca artesanal.....                                     | 54     |
| Figura 19 - Órgãos responsáveis pela atividade enzimática do conjunto de vísceras de corvina nos valores de pH de maior atividade.....                          | 55     |
| Figura 20 - Efeito da temperatura na atividade enzimática do estômago da corvina ( $[S] = 1\%$ proteína).....                                                   | 56     |
| Figura 21 - Efeito da temperatura na atividade enzimática do intestino da corvina ( $[S] = 1\%$ proteína)....                                                   | 56     |
| Figura 22 - Efeito da temperatura na atividade enzimática do estômago da corvina.....                                                                           | 57     |
| Figura 23 - Efeito da temperatura na atividade enzimática do intestino da corvina a pH 7 .....                                                                  | 58     |
| Figura 24 - Efeito da temperatura na atividade enzimática do intestino da corvina a pH 9 .....                                                                  | 59     |

|                                                                                               | Página |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------|--------|
| Figura 25 - Efeito da temperatura na atividade enzimática<br>do fígado da corvina.....        | 60     |
| Figura 26 - Efeito da temperatura na atividade enzimática<br>do ceco pilórico da corvina..... | 61     |

## RELAÇÃO DE TABELAS

|             |                                                                                                                                                      | Página |
|-------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------|
| Tabela I    | - Desembarque de corvina no Rio Grande do Sul ( em relação ao desembarque total de pescado na área). . . . .                                         | 3      |
| Tabela II   | - Desembarque de pescado fresco no Rio Grande do Sul - <u>t</u> (principais espécies)                                                                | 4      |
| Tabela III  | - Classificação de enzimas proteolíticas.                                                                                                            | 10     |
| Tabela IV   | - Atividade catéptica do músculo de pe-<br>cado e do músculo de mamíferos. . . . .                                                                   | 19     |
| Tabela V    | - Distribuição das enzimas proteolíticas<br>nos órgãos dos vertebrados. . . . .                                                                      | 21     |
| Tabela VI   | - Comparação entre a atividade proteolít-<br>tica de extrato do intestino, fígado e<br>ceco pilórico e a atividade da tripsina<br>comercial. . . . . | 62     |
| Tabela VII  | - Comparação entre a atividade proteolít-<br>tica de extrato de vísceras da corvina<br>e a soma das atividades dos órgãos com-<br>ponentes. . . . .  | 63     |
| Tabela VIII | - Composição química da polpa e das ví-<br>sceras da corvina. . . . .                                                                                | 63     |

## SINOPSE

Realizaram-se alguns estudos experimentais de atividade enzimática proteolítica do extrato do aparelho digestivo da corvina (Microposon furnieri), segundo o seguinte plano de trabalho:

### 1- Provas da existência de atividade enzimática proteolítica

Incubaram-se homogeneizados do tubo digestivo da espécie Microposon furnieri com albumina bovina, controlados a temperatura e pH. Por fracionamento em Gel de Sephadex, comparou-se o peso molecular da albumina com os dos produtos da incubação. Constatou-se o aumento de peptídeos de pesos moleculares menores, às expensas dos de pesos moleculares maiores. Quando os homogeneizados foram fervidos por alguns minutos, ou quando substituídos por solução tampão, a ação proteolítica desapareceu.

### 2- Influência do pH a temperatura constante

Quando se repetiram as incubações dos homogeneizados do tubo digestivo com polpa de peixe, entre pH 2 e 10, encontraram-se três picos de pH de máxima atividade, um na faixa ácida, a pH 3, um na zona neutra a pH 7 e um na faixa alcalina a pH 9.

Estudos complementares permitiram provar que a atividade na faixa ácida era devida especialmente ao estômago, e na faixa neutra e alcalina, ao intestino, fígado e ceco pilórico.

Ao incubar hidrolisados obtidos por ação do extrato estomacal sobre albumina, com extratos do intestino, fígado e ceco pilórico, encontraram-se níveis percentuais no grau de hidrólise.

### 3-- Influência da temperatura a pH constante

Extratos do estômago, intestinal, fígado e ceco pilórico foram incubados a várias temperaturas, na faixa de 30 a 60°C, a pH constante. Encontraram-se, assim, temperaturas ótimas de atividade dos diferentes extratos.

## SUMMARY

Some experimental studies of the proteolytic enzymatic activity of extracts from the digestive system of the croaker (*Micropogon furnieri*) were made according to the following plan:

### 1 - Evidence of the existence of the proteolytic enzymatic activity.

Homogenates of the digestive tube of the *Micropogon furnieri* species were incubated with bovine albumin at controlled temperature and pH. The molecular weight of the albumin was compared with that of the incubation products by separating them with Sephadex Gel. An increase of peptides of lesser molecular weight was observed, as well as a decrease of those of greater weight. When the homogenates were boiled for some minutes or replaced by a buffer solution the proteolytic action ceased completely.

### 2 - Influence of pH at a constant temperature.

When incubations of digestive tube homogenates were repeated, with fish pulp three peaks of pH activity were found between pH 2 and pH 10. One was in the acid zone, at pH 3; one in the neutral zone, at pH 7; and one in the alkaline zone, at pH 9.

Complementary studies established that the activity in the acid zone was due mainly to the stomach, and in the neutral and alkaline zones, to the intestine, liver, and pyloric saccul.

When hydrolytes obtained through activity of stomach extract on albumen were incubated with extracts of intestine, liver, and pyloric caecum, the degree of hydrolysis was definitely higher.

### 3 - Influence of temperature at a constant pH.

Extracts of stomach, intestine, liver, and pyloric caecum were incubated at several temperature from 30 to 60°C at a constant pH. By this procedure the optimum temperature for the activity of the different extracts was determined.

## 1 - INTRODUÇÃO

O presente trabalho é uma contribuição ao estudo das enzimas proteolíticas do aparelho digestivo do pescado, mais especificamente da espécie Micropogon furnieri (corvina), objetivando sua utilização como catalisador da hidrólise da polpa de pescado.<sup>1</sup>

A hidrólise enzimática da polpa resulta em produtos solúveis de proteína que, após concentrados, constituirão o concentrado proteico de peixe (FPC), o qual pode ser uma apreciável alternativa na formulação ou no enriquecimento de produtos para a alimentação humana, tais como substitutos lácteos, pó solúvel para sopa instantânea, enriquecimento proteico de pão e refrigerantes e suprimento de certos aminoácidos essenciais a produtos proteicos vegetais.

Todo pescado de menor preferência pelo consumidor são valorizados como matéria-prima quando utilizados em forma de produtos que não são designados pelo nome da espécie, tais como os "prontos para servir" (ready to serve), os "prontos para cozinhar" (ready to cook), os embutidos e os concentrados proteicos de peixe (FPC).

A possibilidade de utilização de espécies não indicadas para o consumo direto e de resíduos de peixe resultantes de outros processos, os quais em máquina separadora de ossos e de pele apresentam alto rendimento em polpa, faz do FPC a mais barata fonte de proteína animal.

---

1 - doravante, simplesmente polpa.

As vísceras de corvina como de outros pescados no Rio Grande do Sul são aproveitadas somente para a produção de farinhas para a alimentação animal. Seu uso como fonte de enzimas consistiria, igualmente, em grande valorização dessa matéria-prima, podendo, por outro lado, contribuir para o barateamento do processo de hidrólise e, portanto, do produto final.

O custo do processo é fator de grande importância a ser considerado no desenvolvimento de novos produtos, porque a baixa de preço acarreta acréscimo no poder de compra do consumidor e possibilita sua utilização por populações de baixa renda.

No presente trabalho investigou-se, especialmente, a atividade proteolítica das vísceras em diferentes condições de pH e de temperatura, avaliando-se, ao mesmo tempo, o peso molecular dos hidrolisados obtidos.

O estudo foi realizado com a espécie Micropogon furnieri, por tratar-se de pescado de grande produção no Rio Grande do Sul (Tabelas I e II).

TABELA I - Desembarque de corvina no Rio Grande do Sul (em relação ao desembarque total de pescado na área)

| ANO    | DESEMBARQUE DE<br>CORVINA<br>(toneladas) | DESEMBARQUE TO-<br>TAL DE PESCAÇO<br>(toneladas) | %  |
|--------|------------------------------------------|--------------------------------------------------|----|
| 1970 a | 18 715                                   | 74 694                                           | 25 |
| 1971 a | 22 708                                   | 97 539                                           | 23 |
| 1972 a | 22 011                                   | 102 459                                          | 21 |
| 1973 a | 20 006                                   | 119 915                                          | 17 |
| 1974 a | 17 147                                   | 102 430                                          | 17 |
| 1975 b | 16 988                                   | 103 000                                          | 16 |
| 1976 b | 16 477                                   | 117 263                                          | 14 |
| 1977 c | 21 159                                   | 120 697                                          | 18 |

Fontes: a) SUDEPE - FAO. PDP - Série Documentos Ocasionais nº 15, 1976 (30)

b) SUDEPE - FAO. FDP - Desembarque de Pescado no Rio Grande do Sul, 1976 (31)

c) SUDEPE - FAO. FDP - Desembarque de Pescado no Rio Grande do Sul, 1977 (32)

TABELA II - Desembarque do pescado fresco no Rio Grande do Sul - t (principais espécies)

| ESPÉCIES | 1970   | %   | 1971   | %   | 1972    | %   | 1973    | %   | 1974    | %   |
|----------|--------|-----|--------|-----|---------|-----|---------|-----|---------|-----|
| Corvina  | 18 715 | 25  | 22 708 | 23  | 22 011  | 21  | 20 006  | 17  | 17 147  | 17  |
| Merluza  | 16 659 | 22  | 17 560 | 18  | 22 523  | 22  | 26 705  | 22  | 21 626  | 22  |
| Castanha | 2 413  | 3   | 4 457  | 5   | 5 839   | 6   | 15 337  | 13  | 13 580  | 13  |
| Pescada  | 4 040  | 5   | 6 924  | 7   | 5 744   | 6   | 8 378   | 7   | 8 515   | 8   |
| Savelha  | 984    | 1   | 2 338  | 2   | 4 246   | 4   | 8 885   | 7   | 6 061   | 6   |
| Anchova  | 5 958  | 8   | 12 353 | 13  | 3 809   | 4   | 3 095   | 3   | 4 442   | 4   |
| Camarão  | 5 012  | 7   | 4 891  | 5   | 8 223   | 8   | 575     | -   | 5 031   | 5   |
| Tainha   | 4 232  | 6   | 1 821  | 2   | 3 765   | 4   | 675     | -   | 1 987   | 2   |
| Pargo    | 68     | -   | 279    | -   | 206     | -   | 5 912   | 5   | 2 497   | 2   |
| Outras   | 16 583 | 23  | 24 208 | 25  | 26 093  | 25  | 30 347  | 26  | 21 544  | 21  |
| TOTAL    | 74 664 | 100 | 97 539 | 100 | 102 459 | 100 | 119 915 | 100 | 102 430 | 100 |

Extraído da SUDEPE - FAO - Série Documentos Ocasionais, nº 15 (30)

## 2 - ABREVIATURAS E CONCEITOS

### 2.1 - ABREVIATURAS

[S] = concentração de substrato

[E] = concentração de enzimas

T = temperatura

t = tempo

$\mu$ gt = microgramas de tirosina

U.E. = unidade enzimática

U.E./ g proteína = unidade enzimática por grama de proteína

$\lambda$  = comprimento de onda

Prot. extrato/prot. polpa = proteína do extrato sobre proteína da polpa.

FPC = concentrado proteico de peixe (de Fish Protein Concentrate)

TCA = ácido tricloroacético

D.O. = densidade ótica

### 2.2 - CONCEITOS

Branco de reagentes: obtido com a substituição da amostra por água destilada nas reações de avaliação da atividade enzimática.

Branco tempo zero: obtido com a coleta da amostra, no mo-

mento em que se coloca a enzima em contato com o substrato, interrompendo-se imediatamente a atividade enzimática.

Branco de polpa: obtido com a substituição da polpa por solução tampão nas reações enzimáticas.

Branco de enzima: obtido com a substituição da enzima por solução tampão nas reações enzimáticas.

Amostra de controle simples: retirada após qualquer adição, durante a reação enzimática.

Amostra de controle reconstituída: amostra em que se reconstitui um sistema de proporções de enzima e de substrato, em qualquer momento da reação enzimática, mas em supostas condições de que a hidrólise não houvesse sido efetuada.

### 3 - REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

#### 3.1 - APARELHO DIGESTIVO DO PESCADO

Os principais componentes do aparelho digestivo do pescado, no ponto de vista da produção de enzimas proteolíticas, são o estômago, o intestino, o fígado, o pâncreas e o ceco pilórico.

O estômago desempenha três funções principais: "armazenamento dos alimentos, enquanto não passam ao intestino, tratamento físico do alimento e primeiras fases do tratamento químico das proteínas" (24).

No intestino tem lugar a maior parte dos fenômenos químicos da digestão, sendo também um importante local de absorção de alimentos para sua utilização pelo organismo (24).

O fígado, entre outras funções, auxilia na digestão dos alimentos, especialmente dos lipídios; nele se realiza a síntese de proteínas. É um órgão que se torna importante, sob o ponto de vista da digestão das proteínas, em espécies de peixes que apresentam células pancreáticas nele disseminadas, constituindo o hepatopâncreas.

O ceco pilórico são pequenas bolsas localizadas entre o estômago e o intestino (Figura nº 1) de função não inteiramente conhecida. Segundo Romer (24), "nestas bolsas... podem alojar-se alimentos para serem absorvidos". Segundo Nicol (20), o ceco pilórico dos peixes teleósteos secretam um complemento de enzimas digestivas semelhantes àsquelas do intestino e, ainda segundo o mesmo autor, no ceco pilórico ocorre também absorção de alimentos. Segundo Philips Jr. (23), os cecos pilóricos dos peixes são

fontes de enzimas proteolíticas. Segundo Hamoir (8), o ceco pilórico nos peixes tem função semelhante àquela do pâncreas dos mamíferos e é importante fonte de enzimas tripticas. Togasawa et alii (35) obtiveram uma protease purificada do ceco pilórico de bonita e prepararam uma protease purificada do ceco pilórico da tuna.

O pâncreas é o principal órgão no ponto de vista da produção de enzimas utilizadas no processo da digestão. A principal função do pâncreas é de glândula exócrina, porém o pâncreas realiza também uma função de natureza endócrina.

Segundo Eppler (7), todos os peixes têm tecido pancreático endócrino e exócrino e, de acordo com recentes descobrimentos, foi possível diferenciar quatro tipos de pâncreas em peixes, desde um pâncreas totalmente compacto a um pâncreas difuso. O pâncreas na maioria dos teleósteos é do tipo actinopterigiano, ou seja, um tipo de pâncreas que tende a dispersar-se por toda a cavidade do corpo (pâncreas difuso) ou em algum de seus órgãos (pâncreas disseminado), e com uma parcial separação de tecidos endócrinos e exócrinos. Dessa forma, órgãos como o fígado, o baço e o ovário podem tornar-se de importância sob o ponto de vista da atividade enzimática proteolítica.

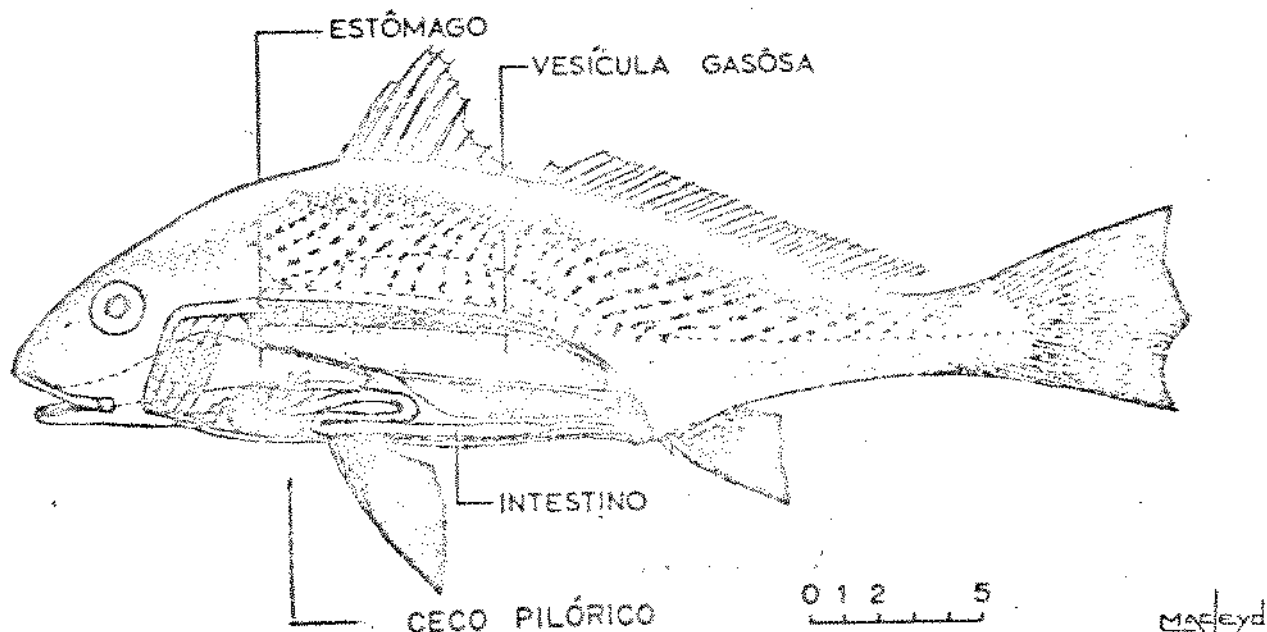


Fig. 1 - Corvina (*Micropogon furnieri*): Representação esquemática da forma do corpo e estrutura dos órgãos. Extraído do Bol. Inst. Pesca (33).

### 3.2 - GENERALIDADES SOBRE A ESPÉCIE Microgogon furnieri

A corvina é um teleósteo pertencente à família Sciaenidae, espécie Microgogon furnieri.

Tanji (33) analisou o conteúdo estomacal de 943 indivíduos dessa espécie, capturados na região compreendida entre o Cabo de Santa Marta Grande (latitude 28°S) e Maldonado (latitude 35°S), e verificou que uma alta frequência de estômagos continham somente poliquetas (40,2%). Peixe era o próximo alimento em frequência (8,72%). Poliquetas e camarões ocorreram juntos em 4,4% dos estômagos. 34,7% dos estômagos não puderam ter seus conteúdos identificados devido ao avançado processo digestivo. Conclui-se que a corvina é um peixe essencialmente carnívoro e podemos supor que suas vísceras sejam importante fonte de enzimas proteolíticas.

### 3.3 - PRINCIPAIS PROTEASES DO APARELHO DIGESTIVO

Enzimas proteolíticas pertencem ao grupo das hidrolases e caracterizam-se por romper um elo peptídico. Conforme indica Dixon (6), as proteases normalmente encontradas no aparelho digestivo dos vertebrados são de dois tipos: endopeptidases e exopeptidases. As endopeptidases agem no meio da cadeia peptídica, rompendo moléculas proteicas em fragmentos menores. As exopeptidases não podem hidrolisar elos no meio da cadeia, algumas agem no grupo carboxila terminal, outras no grupo amina terminal da cadeia peptídica, removendo os aminoácidos terminais um a um. A diferença nos dois tipos é apenas uma questão de especificidade da enzima; depende, pois, da natureza dos grupos químicos na vizinhança do enlace peptídico. Enquanto um tipo, endopeptidase, não requer um grupo adjacente terminal, carboxila ou amina, o outro tipo, exopeptidase requer esses grupos terminais livres. As endo e exoenzimas cooperam com igual eficiência no processo da digestão, sendo a função das endopeptidases a de produzir um grande número de extremidades livres em que as exopeptidases podem agir. Assim, pela ação das exopeptidases, tem-se um grande número de ami-

ácidos livres no produto da hidrólise.

A viscosidade, a textura, o sabor e outras propriedades do produto da hidrólise dependerão em grande parte dos tipos de enzimas, ou melhor, da especificidade da enzima.

A Tabela III é uma modificação da tabela de Bergman-Fruton<sup>2</sup>, apresentando três grupos principais de enzimas proteolíticas e o elo atacado em cada caso.

Tabela III - Classificação de enzimas proteolíticas

| GRUPO Nº | ELO ATACADO                                                                                                           | CLASSIFICAÇÃO    |
|----------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------|
| I        | $\text{NH}_2 - \overset{\text{R}}{\underset{ }{\text{CH}}} - \text{CO} - \overset{\text{R}}{\underset{ }{\text{NH}}}$ | Aminopeptidase   |
| II       | $\text{COOH} - \overset{\text{R}}{\underset{ }{\text{NH}}} - \text{COOH}$                                             | Carboxipeptidase |
| III      | $\text{COOH} - \text{NH} - \overset{\text{R}}{\underset{ }{\text{CH}}} - \text{CO} - \text{NH}_2$                     | Endopeptidase    |

Tabela de Bergman-Fruton modificada<sup>2</sup>

As exopeptidases classificam-se em carboxipeptidases e aminopeptidases, conforme possuem um grupo terminal carboxila ou amina livre, respectivamente.

Enzimas que se caracterizam por serem endocelulares serão estudadas em um grupo a parte neste trabalho, embora apresentem tipos que pertencem às duas classes principais de enzimas proteolíticas, ou seja, às classes endopeptidases e exopeptidases. Portanto, a revisão sobre enzimas proteolíticas será dividida em:

3.3.1 - Endopeptidases

3.3.2 - Aminopeptidases

2 - FRUTON, J.S. et alii. J. Biol. Chem., 4, 111, 1936

### 3.3.3 - Carboxipeptidases

### 3.3.4 - Enzimas proteolíticas endocelulares

### 3.3.1 - Endopeptidases

As principais endopeptidases do aparelho digestivo são a tripsina, quimotripsina e a pepsina

#### 3.3.1.1 - Tripsina

A principal fonte de tripsina é o pâncreas, onde é produzida, em forma de precursor inativo, pré-enzima ou zimógeno, nos corpúsculos de Golgi (16).

A enzima proteolítica tripsina e seu precursor inativo foram obtidos pela primeira vez, em forma cristalina, por Northrop e Kunitz.

A ativação do tripsinógeno para transformá-lo em tripsina resulta da clivagem específica do elo  $\text{Lys}_6\text{-Ile}_7$ , próximo ao N-terminal (23), catalisada pela enzima enteroquinase (uma enzima segregada pelas células da mucosa intestinal) ou pela própria tripsina, segundo o esquema da Figura nº 2.

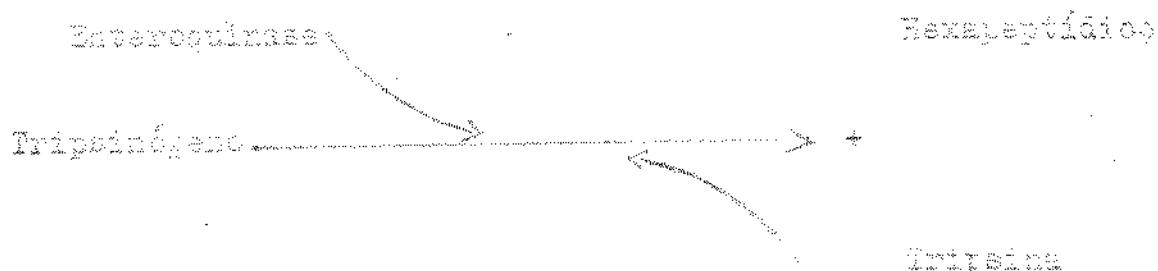


Fig. 2 - Ativação do tripsinógeno, extração de López e de Hawir (9) (16)

Traços de tripsina produzidos no início da reação são suficientes para progredir autocataliticamente a reação (16). O extrato fresco de pâncreas ou o suco pancreático recém-segregado carecem de atividade proteolítica (23). Ao entrar no intestino, o suco imediatamente torna-se ativo. Adquire atividade também

quando o pâncreas se conserva a pH 4-5 durante 24 horas a temperatura ambiente.

Karlson (13) apresenta um esquema de como se dá a ativação do zimógeno (Figura nº 3).

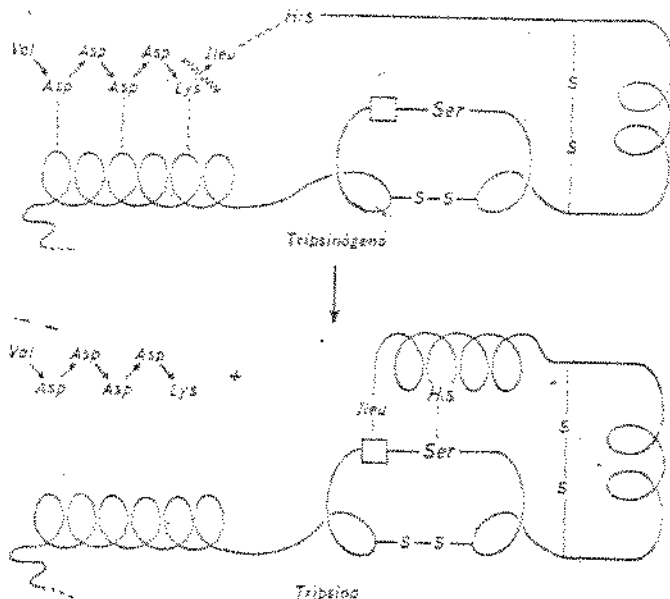


Fig. 3 - Ativação do tripsinógeno, extraído de Karlson (13)

Como pode ser apreciado no esquema, o aparecimento da atividade é acompanhado por mudanças conformacionais na estrutura da proteína.

O processo de ativação autocatalítica do tripsinógeno é acelerado pela presença de íons cálcio.

O peso molecular do tripsinógeno, segundo Marches e Mourren<sup>3</sup>, é 23 991; o da tripsina, 23 500<sup>4</sup>.

O pH ótimo para a atividade da tripsina está próximo a 8,0 (entre 7,0 e 9,0) (9) (16). Há máxima estabilidade a pH 2,3 (16) (36). Ela hidrolisa enlaces peptídicos nos quais participam a L-lisina e L-arginina, pondo em liberdade o grupo carboxílico. Essa tão estreita especificidade de ação é uma característica mar-

3 - MARCHES, G e MOURREN. Bull. Soc. Chemistry biol, apud WALSH, K. A., 1970.

4 - TIETZE, J. J. Biol. Chem., apud SMITH, E.L. [s.d.]

cante da tripsina. Outra característica marcante da tripsina é a rápida autólise experimentada pela tripsina em pH de ótima atividade catalítica.

A proteína nativa é atacada pela tripsina mais lentamente que a desnaturada porque a estrutura secundária intacta é uma barreira para a proteólise. Assim, a desnaturação do substrato facilita a ação triptica (16). A atividade enzimática proteolítica da tripsina é aumentada pela presença de íons magnésio. Os íons de metais pesados, como cobre, mercúrio e prata, bem como fosfatos inorgânicos, ácido sulfúrico, cloroformo, glicerina, açúcar, lecitina, heparina, sais de quinina, alcalóides, gorduras e outros, são fortes inibidores.

A tripsina em estado seco suporta um rápido aquecimento até 100 ou até 160°C, porém as soluções aquosas se inativam já a 60-80°C. Os preparados liofilizados conservados secos e ao frio são estáveis durante anos (16). A tripsina é também estável a pH 3,0, em baixas temperaturas, onde pode ser armazenada por semanas sem perda de atividade (16).

### 3.3.1.2 - Quimotripsina

Quimotripsina, tripsina e carboxipeptidase são as principais enzimas elaboradas pelo pâncreas (9).

Quimotripsina é conhecida há muitos anos, desde os trabalhos pioneiros de Nordup e Emilin (21).

Existe uma família de quimotripsinas que resultam de ativação, em diferentes graus de alteração proteolítica, de dois diferentes precursores inativos: quimotripsinógeno A e quimotripsinógeno B.

A ativação do quimotripsinógeno é catalisada pela tripsina. A enteroquinase, embora não seja catalisador da reação de ativação do quimotripsinógeno, possui uma ação indireta na ativa-

ção, por sua ação sobre o tripsinógeno (9).

De modo geral, todas as quimotripsinas exibem semelhante especificidade (19). Quimotripsina age nos elos peptídicos envolvendo grupo carboxílico de tirosina e fenilalanina (9).

Apresentam máxima atividade catalítica a pH 7,5 a 9,0. Estudos da estrutura e catálise têm sido realizados com mais detalhe em quimotripsinógeno A e em quimotripsina A (3). Por longo tempo foi considerado que o quimotripsinógeno A se apresentara no pâncreas em muito maior proporção que o quimotripsinógeno B. Wilcox (35) indica que o zimógeno B é encontrado no pâncreas numa quantidade de cerca de 1/4 daquela apresentada pelo zimógeno A. Contudo, com o desenvolvimento de métodos de purificação cromatográfica desenvolvidos por Keller et alii<sup>5</sup>, tem-se verificado que quimotripsinógeno A e quimotripsinógeno B se apresentam no pâncreas aproximadamente na mesma quantidade (5).

### 3.3.1.3 - Pepsina

Segundo Hook, a pepsina é a mais característica enzima do suco gástrico (9). Ela é a responsável principal pelo início da digestão das proteínas, a qual é iniciada no estômago.

A pepsina forma-se na mucosa gástrica em forma de precursor inativo, o pepsinógeno, o qual é imediatamente convertido em pepsina em pH ácido. Essa reação de ativação do zimógeno é catalisada pela própria pepsina.

O pepsinógeno apresenta um peso molecular de 42 600 e a pepsina um peso molecular de cerca de 35 600.

O pH ótimo para sua ação está compreendido entre 1,0 e 3,0. Experimenta forte autólise em valores de pH alcalino de 4,0, ou seja, na faixa onde é mais ativa, e experimenta desnaturação irreversível em valores de pH acima de 6,0 (5).

---

5 - KELLER, F.S. et alii. J.Biol.Chem., apud CURTISMAN, I. 1965.

A exata especificidade dessa enzima é bem conhecida. Ela age mais vagarosamente sobre proteínas que as demais enzimas proteolíticas (6). "O produto da hidrólise péptica é quase sempre uma mescla de polipeptídios" (13). "Em termos médicos a pepsina hidrolisa 10% dos enlaces peptídicos, resultando peptídios cujo peso molecular, segundo a duração do ataque, oscila entre 300 e 3 000" (13).

Há alguma evidência de ação sinérgica das várias endopeptidases, podendo a ação de uma descobrir um elo praticamente inacessível a outra.

### 3.3.2 - Aminopeptidases

As aminopeptidases separam a aminoácido do grupo amina terminal. Têm sido estudadas quatro principais aminopeptidases. A leucina-aminopeptidase tem como principal fonte a mucosa intestinal, o baço e rins, plantas e bactérias (34). Essa enzima foi descoberta por Lindersroem-Lang<sup>6</sup>. Apresenta um pH ótimo em torno de 9,0 (34), 9,1 e 9,3, segundo LOPEZ (13).  $Mg^{+2}$  e  $Kn^{+2}$  agem como ativadores de reação catalítica da leucina-aminopeptidase, agindo também como estabilizadores dessa enzima. Agem como inibidores os seguintes íons:  $Zn^{+2}$ ,  $Pb^{+2}$ ,  $Ca^{+2}$  (16) e os ânions que são capazes de ligar o magnésio, tais como citrato, pirofosfato e EDTA (16). Rompe os resíduos N-terminais com um grupo amina de leucina ou afins, mas especialmente de leucina (16). Os preparados secos se conservam meses a 0-4°C.

As demais aminopeptidases, tais como a aminocil oligopeptídio hidrolase, a aminocil depeptídio hidrolase e propril-peptídio hidrolase, não são importantes nos órgãos em estudo no presente trabalho.

As aminopeptidases da mucosa intestinal agem nos produtos da digestão péptica e triptica (33).

---

6 - LINDERSROEM & LANG. 2. Physiol. Chem. apud TAUBER, H., 1955

### 3.3.3 - Carboxipeptidases

As carboxipeptidases separam o aminoácido do grupo C-terminal ( $\text{COO}^-$ ). Requerem, pois, uma carga negativa (9) (16). A atividade carboxipeptidase do suco pancreático, segundo Hawk (9), é devida a uma mistura de enzimas.

As carboxipeptidases são segregadas principalmente no pâncreas (16) e existem no intestino, baço e rins (13), sendo que no suco intestinal se apresentam em grandes quantidades. São conhecidas, segundo López (16), três carboxipeptidases: a carboxipeptidase A, a carboxipeptidase B e a carboxipeptidase da levedura.

A carboxipeptidase A é segregada abundantemente pelo pâncreas, em forma de pré-carboxipeptidase A, que é ativada autocataliticamente ou pela tripsina (16). Tem como pH ótimo para sua atividade o pH 7,4. O peso molecular da pré-carboxipeptidase A é 96 000; o da carboxipeptidase A, 34 300, representando, portanto, cerca de terça parte do zimógeno.

A carboxipeptidase A (ácida) separa os L-aminoácidos do grupo C-terminal, salvo se o aminoácido terminal é um aminoácido básico ou prolina, que atuam como inibidores (16).

A primeira obtenção de carboxipeptidase em forma cristalina foi realizada por Anson<sup>7</sup>.

A carboxipeptidase B (básica) foi isolada em mais recentes anos (5). É também elaborada pelo pâncreas e atua sobre peptídeos, tendo um resíduo C-terminal de L-arginina (16) (18). Libera aminoácidos básicos com grupo carboxílico extramó e, por isso, está em condições de prosseguir a hidrólise pela ação da tripsina (13).

Um extrato salino de pâncreas fresco não contém carboxipeptidase (11). A atividade surge quando o extrato é exposto a 37°C.

---

7 - ANSON, M.L., J. Gen. Physiol. Chem., apud FALICK, H., 1956.

A especificidade de carboxipeptidase assemelha-se à da quimotripsina (16).

#### 3.3.4 - Enzimas proteolíticas endocelulares

Enzimas proteolíticas endocelulares são encontradas em certos órgãos animais e no músculo. O reconhecimento de que músculos e certos órgãos possuem proteases origina-se da observação da autólise dos tecidos após a morte do animal (28). As proteases endocelulares animais foram denominadas catepsinas por Willstatter e Bamman (2)

As principais fontes de catepsinas são rins, baço e fígado (16) (28) (37), bem como leucócitos, plaquetas e eritrócitos (16). Parece segura a presença de catepsinas também no estômago (16); nesse caso, uma catepsina não intracelular (13). A importância da catepsina na digestão tem sido estudada por diversos autores. Considera-se que a catepsina gástrica e a pepsinase originam de uma substância comum, fundamental, designada como protease gástrica, que por transformações ainda não conhecidas adquirem a propriedade de hidrolisar proteínas em meio fortemente ácido.

A presença da catepsinas no estômago de vários animais, incluindo espécies de peixe, tem sido estabelecida por Bucks<sup>8</sup>. Tem sido observada atividade catéptica em músculo esquelético de peixes e mamíferos. Considerável trabalho tem sido feito em relação às enzimas catépticas do fígado, baço e rins, mas relativamente pouco em relação ao músculo (25).

Há vários tipos de catepsinas (2), as quais agem num intervalo de pH 5,0 a 7,0, ou seja, de ligeiramente ácido a neutro (16). Hedin<sup>9</sup> distinguiu duas enzimas no baço, uma atuando otimamente na fibrina a cerca de pH 4,0 e a outra de pH 7,0 a 8,0.

As catepsinas não são obtidas na forma de precursores como as enzimas proteolíticas digestivas (16). A especificidade

8 - BUCKS, S. Z. Vergleich Phisiol. apud HAMOIR, G., 1955.

9 - HEDIN, S.G. J Phisiol. apud BERGMAN, M., 1942.

apresentada pelos diversos tipos de catepsinas é toda representada entre as enzimas gastrointestinais (28). Algumas catepsinas pertencem ao grupo das endopeptidases e outras ao das exopeptidases. Assim, catepsinas I e II são endopeptidases, e catepsinas III e IV são exopeptidases (2) (16).

A maioria das catepsinas são somente ativas na presença de certas substâncias redutoras, tais como cisteína, ácido cianídrico, ácido ascórbico, ácido sulfídrico (37).

As catepsinas estão localizadas principalmente no lisossoma das células. As catepsinas endocelulares não agem no animal vivo. Devido à queda de pH "post-mortem", pelo acúmulo de ácido láctico, enzimas, que não as catepsinas, agem sobre as paredes dos lisossomas, liberando as catepsinas. Elas, então, começam a agir. A principal teoria que explica o mecanismo de pós-rigor é o da autólise dos tecidos pelas catepsinas.

Segundo Huang e Tappel (10), a degradação da proteína do tecido muscular dos mamíferos se verifica segundo o mecanismo ilustrado na Figura nº 4

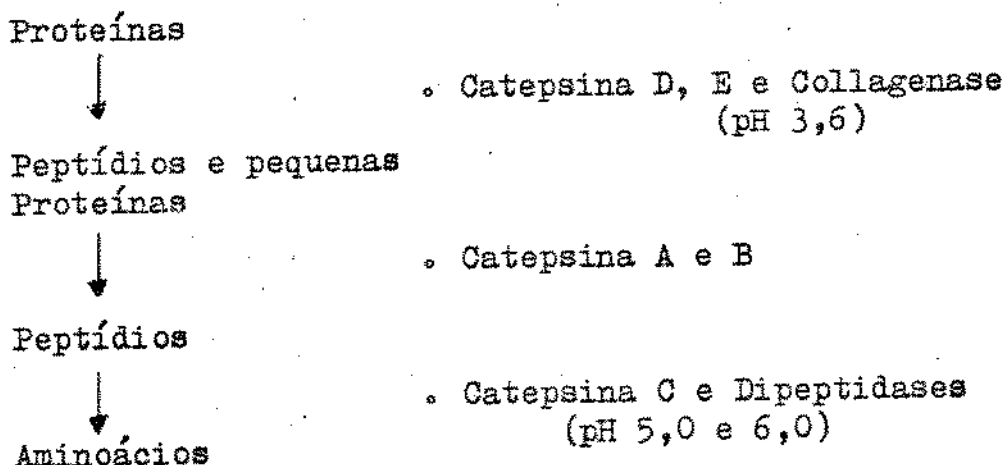


Fig. 4 - Mecanismos da degradação da proteína do tecido muscular dos mamíferos, segundo Huang e Tappel (10).

Siebert e Schmitt (26) mostraram que os músculos de peixe exibem uma mais alta atividade catéptica que os tecidos de mamíferos. A Tabela IV, dada por Siebert e Schmitt (26), mostra a

atividade catéptica de diferentes peixes e mamíferos

TABELA IV - Atividade catéptica do músculo de pescado e do músculo de mamíferos

| MÚSCULO DO PEIXE | ATIVIDADE<br>(a) | MÚSCULO DE MAMÍFERO | ATIVIDADE<br>(a) |
|------------------|------------------|---------------------|------------------|
| Bacalhau         | 80               | Rato                | 10               |
| Arenque          | 41               | Porco               | 7                |
| Solha            | 52               | Rês                 | 8                |
| Linguado         | 95               | Coelho              | 5                |
| Truta            | 50               |                     |                  |
| Carpa            | 36               |                     |                  |

Extraído de Siebert e Schmitt (26)

(a) A atividade é dada em mM de tirosina, tornada ácido solúvel em TCA por minuto e por grama de músculo a 37°C.

Extratos de tecido de peixe não agem sobre os mais importantes substratos sintéticos para enzimas proteolíticas e, considerando sua maior atividade proteolítica, tem sido suposto que as catepsinas de peixe e de mamíferos diferem em especificidade (27).

Têm sido encontradas diferenças nos valores de pH e de temperatura ótimos entre as catepsinas do pescado e as dos mamíferos, sendo geralmente mais baixo o pH ótimo para as catepsinas do peixe (27).

A catepsina I, também chamada catepsina A ou pepsinase de baço de boi, é homoespecífica com a pepsina. Difere, contudo, da pepsina no valor de pH ótimo para sua atividade. Algumas das fontes de catepsina I são o estômago, rins e baço de boi (2). A atividade proteolítica da catepsina I é bem maior que a apresentada pela pepsina (2).

Catepsina II, também chamada catepsina B ou tripsinase catéptica, é homoespecífica com a tripsina. Difere da tripsina em

seu pH ótimo, que é cerca de 4,9, e difere também porque só age na presença de um ativador (cisteína). Baço e rins são fontes de catepsina II.

Catepsina III, também chamada catepsina C ou catéptica leucina aminopeptidase, é homoespecífica com a leucina aminopeptidase da mucosa intestinal (2). Requer ativadores (cisteína ou ácido ascórbico). O pH ótimo para sua atividade é o pH 5,0.

Catepsina IV, também chamada catepsina D ou carboxipeptidase catéptica, é homoespecífica com a carboxipeptidase pancreática. Baço e rins são fontes de catepsina IV. Tem como pH ótimo para sua atividade o pH 5,0, conforme Bergman (2); 4,2, conforme López (16).

Fruton et alii<sup>10</sup> distinguiram e caracterizaram várias catepsinas. Eles se referem a uma catepsina V-A e a uma catepsina V-B, as quais apresentam, respectivamente, como substrato específico glicil-L fenilalaminamida e L-fenialanina amida, ambas ativadas por sulfidril.

A Tabela V mostra a distribuição das enzimas proteolíticas nos vários órgãos dos vertebrados.

---

10- FRUTON, J.S. et alii. J. Biol. Chem. apud TAUBER, H., 1956.

TABELA V - Distribuição das enzimas proteolíticas nos órgãos dos vertebrados

| ÓRGÃO     | ENZIMA                                    | pH              |
|-----------|-------------------------------------------|-----------------|
| Estômago  | Pepsina                                   | entre 1,0 e 3,0 |
|           | Catepsina I                               | 5,4             |
| Intestino | Tripsina                                  | entre 7,0 e 9,0 |
|           | Quimotripsina                             | entre 7,5 e 9,0 |
|           | Glicil-glicina hidrolase<br>(dipeptidase) | entre 7,5 e 8,0 |
|           | Carboxipeptidase                          | 7,4             |
|           | Leucina amino peptidase                   | 9,0             |
| Fígado    | Glicil-glicina hidrolase<br>(dipeptidase) | entre 7,6 e 7,8 |
|           | L-propil hidrolase                        | entre 8,0 e 9,0 |
|           | Catepsinas                                | entre 4,0 e 7,5 |
| Pâncreas  | Tripsina                                  | entre 7,0 e 9,0 |
|           | Quimotripsina                             | entre 7,5 e 9,0 |
|           | Carboxipeptidase                          | 7,4             |
| Baço      | Carboxipeptidase                          | 7,4             |
|           | Catepsina I                               | 5,4             |
|           | Catepsina II                              | 4,9             |
|           | Catepsina IV                              | 4,2 ou 5,0      |
|           | Leucina amino peptidase                   | 9,0             |
| Rins      | Carboxipeptidase                          | 7,4             |
|           | Catepsina I                               | 5,4             |
|           | Catepsina II                              | 4,9             |
|           | Catepsina IV                              | 4,2 ou 5,0      |
|           | Leucina amino peptidase                   | 9,0             |

### 3.4 - EFEITO DO pH NA ATIVIDADE ENZIMÁTICA

Em geral, a atividade enzimática é muito sensível às variações no pH. Ao estudarmos a velocidade da reação enzimática em diversos valores de pH, vamos encontrar um valor de pH em que a atividade é máxima. Esse valor denomina-se pH ótimo. o pH ótimo para a atividade enzimática é determinado pelos seguintes fatores (6):

- a) um efeito do pH na afinidade entre a enzima e o substrato;
- b) um efeito do pH na própria velocidade de reação;
- c) um efeito do pH na estabilidade da enzima.

Os dois primeiros efeitos dependem do estado de ionização dos componentes da reação enzimática (enzima, substrato, cofator, complexo enzima-substrato), o qual, por sua vez, vai depender do valor do pH em que se processa a reação e da constante de ionização dos grupos ionizáveis da proteína. Se o pH de um grupo é menor que o pH do meio, ele encontra-se dissociado; se é maior, encontra-se associado<sup>11</sup>.

Michaelis e Davidson<sup>12</sup> sugerem que só uma das formas iônicas da enzima, ou, mais precisamente, do centro ativo, é cataliticamente ativa, enquanto a ionização dos grupos localizados distantes do centro ativo não teriam efeito na atividade enzimática. Seriam de particular interesse para a atividade catalítica os dois grupos próximos ao centro ativo que primeiro mudam de estado de ionização quando o pH é afastado do ótimo, para os lados ácido e alcalino, respectivamente (6).

Um efeito do pH na própria velocidade de reação, sem

---

11 - O termo "associado" se refere a associação de prótons: os grupos  $\text{COOH}$  e  $\text{NH}_3^+$  dos aminoácidos são ácidos segundo o conceito de Brønsted, e são capazes de dissociar prótons, produzindo  $\text{COO}^-$  e  $\text{NH}_2$ , que são consideradas as formas dissociadas correspondentes.

12 - MICHAELIS, L. & DAVIDSON, E. Biochem. Z. apud Dixon, K & WEBB, E.C., 1967.

sofrer influência da afinidade da enzima com o substrato, é produzido utilizando-se concentração de substrato suficiente para saturar a enzima, de modo que toda esta esteja em forma do complexo enzima-substrato, e, portanto, a velocidade de reação será determinada pela dissociação do complexo enzima-substrato.

O pH ótimo para a atividade de uma enzima pode experimentar pequenas variações com o substrato ou com o tampão utilizado.

O efeito do pH na estabilidade da enzima está relacionado com a estabilidade da proteína enzimática, ocorrendo inativação da enzima nos valores de pH, onde as proteínas enzimáticas se desnaturam.

### 3.5 - EFEITO DA TEMPERATURA NA ATIVIDADE ENZIMÁTICA

A velocidade de uma reação química depende da energia de ativação, ou seja, energia potencial a ser adquirida pela molécula para que experimente reação. Se a energia de ativação de uma determinada reação é baixa, é facilmente atingida pelas moléculas, de modo que a reação se processa muito rapidamente. As moléculas, no sistema, que adquiriram o mínimo de energia necessário para reagirem são chamadas moléculas ativadas. O catalisador age, reduzindo a energia de ativação e, assim, permitindo que a reação se realize mais rapidamente.

Um maior desenvolvimento no estudo do efeito da temperatura na atividade enzimática foi obtido quando se estabeleceu que dois processos independentes são simultaneamente influenciados pela temperatura, numa reação enzimática: uma ação da temperatura na própria velocidade da reação, como se observa em uma reação química qualquer, quando, então, a velocidade da reação é diretamente proporcional à variação da temperatura, e uma ação da temperatura na inativação da enzima, a temperatura favorecendo a inativação. Assim, em valores de temperatura abaixo do ótimo, tem-se uma influência predominante da temperatura na velocidade

da reação enzimática, podendo haver, simultaneamente, parcial inativação da enzima pelo calor. Em temperaturas acima do ótimo, o efeito da temperatura na velocidade da reação não compensa o grau de inativação térmica experimentada pela enzima.

A inativação da enzima pelo calor pode ser estudada em ausência de substrato, submetendo-se a enzima a diversos valores de temperatura e avaliando-se a atividade enzimática por incubar a enzima com o substrato em condições padrão adequadas para a atividade catalítica da enzima em estudo (11).

O efeito real da temperatura na velocidade da reação enzimática, com a participação de apenas uma enzima, sem considerar a inativação da enzima pelo calor, pode ser influenciado pelos seguintes fatores (6):

- a) efeito da velocidade de ruptura do complexo enzima-substrato;
- b) efeito na afinidade da enzima com o substrato;
- c) efeito no pH de algum ou de todos os componentes do sistema, determinado pelo calor de ionização;
- d) efeito na afinidade da enzima por ativadores ou inibidores, quando presentes.

Northrop et alii (21) encontraram forte correlação positiva entre inativação da enzima pelo calor, medida pela perda de atividade de enzimas cristalinos, e a desnaturação das enzimas pelo calor. Esse resultado indica que a inativação da enzima pelo calor se deve, principalmente, à desnaturação das proteínas enzimáticas.

## 4 - MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1 - PREPARO E SUBSTRATO

Foram utilizadas como substrato, nas reações de hidrólise, proteínas da polpa de corvina. A polpa foi obtida, ou mecanicamente, por máquina separadora de ossos e de pele, marca "Debonning Bibum", ou manualmente, forçando-se a carne através de crifícios de uma tela de aço inoxidável, sendo a pressão efetuada por rolos de borracha. A polpa foi armazenada em "freezer" a -25°C. No momento de efetuar a reação enzimática, foi preparada a solução de polpa na concentração e nos valores de pH desejados para a reação, utilizando-se soluções tampão e homogeneizando-se em homogeneizador tipo Waring-Blender. Foram utilizadas as seguintes soluções tampão, de conformidade com os valores de pH:

pH 2,0 - solução tampão de Clark-Lubs (18)

pH 3,0 a 8,0 - solução tampão de Mollivaine (18)

pH 9,0 a 11,0 - solução tampão de Sorensen (glicocol/ácido de sódio) (18)

### 4.2 - PREPARO DOS EXTRATOS ENZIMÁTICOS (Fig. 5)

#### 4.2.1 - Obtenção das vísceras

As vísceras foram extraídas de corvinas adquiridas na indústria pesqueira de Rio Grande-RS, de pesca artesanal ou industrial. Os peixes foram eviscerados nas plantas industriais dos fornecedores de pescado, dentro de um período de 24 horas após o desembarque, período em que se conservavam em gelo, tal como nos

barco de pesca. O estômago e o intestino foram esvaziados de seus conteúdos e lavados rapidamente em água a 0°C.

#### 4.2.2 - Preparo dos extratos

As vísceras foram trituradas a seco e homogeneizadas no homogeneizador tipo Waring-Blendor, sem adição de tampão. No momento de realizar as reações, os extratos foram diluídos para os valores de concentração e pH desejados, utilizando-se as mesmas soluções tampão que as usadas para o preparo das soluções de polpa.

#### 4.3 - REAÇÕES ENZIMÁTICAS (Fig. 5 )

As reações enzimáticas foram realizadas em reator enzimático (Fig. nº 6), nas condições indicadas ao pé dos gráficos, mantendo-se agitação constante.

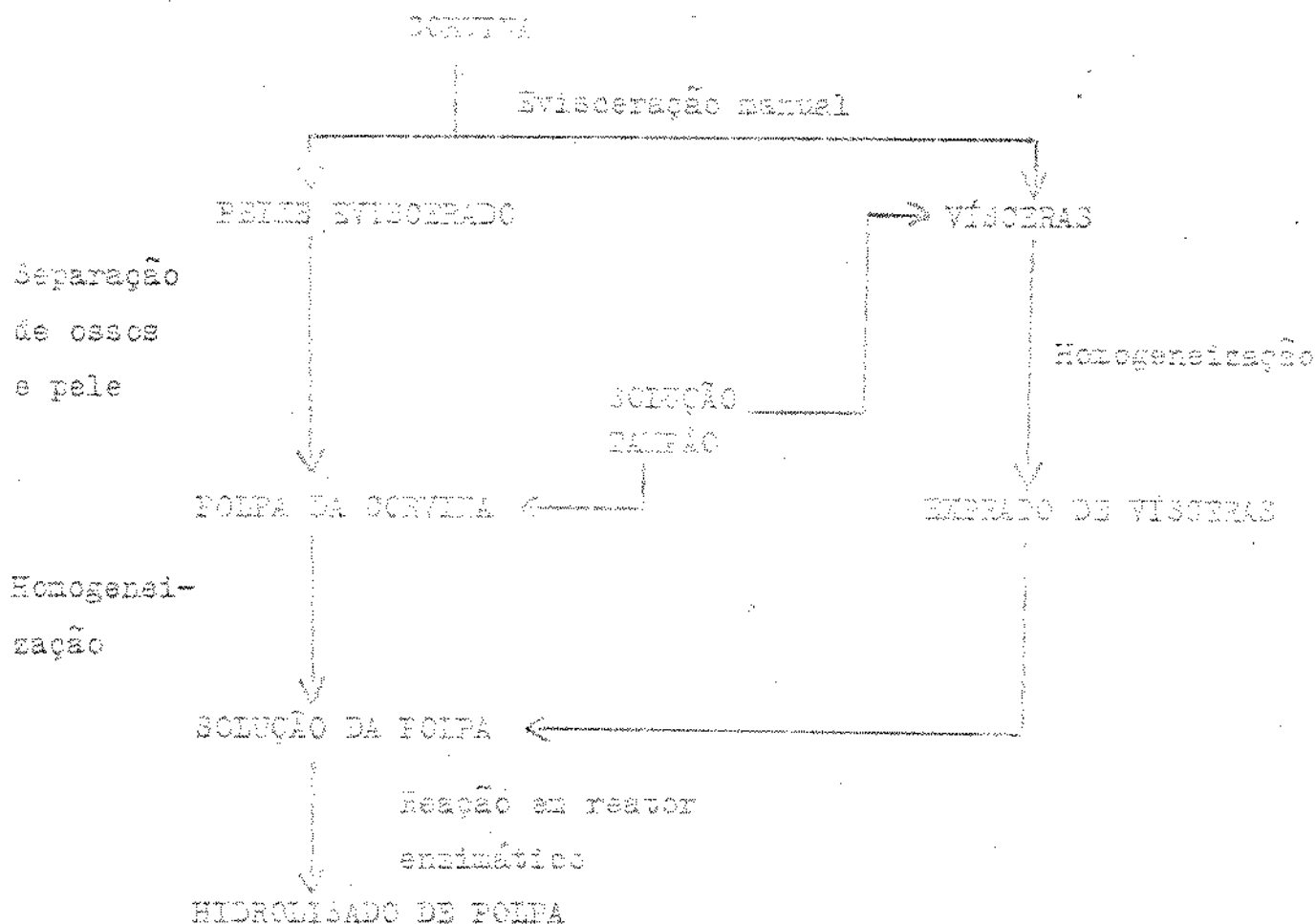


Fig. 5 - Fluxograma da hidrólise de polpa de ocrvina pelo extrato de vísceras do mesmo peixe

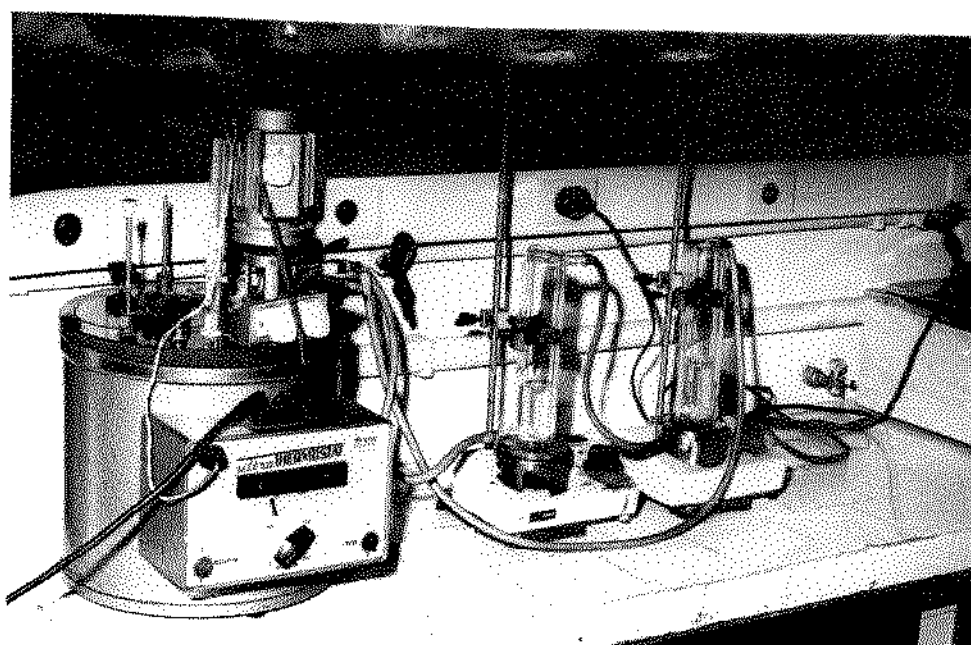


Fig. 6 - Reator enzimático

#### 4.4 - ETAPAS PREPARATÓRIAS PARA AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ENZIMÁTICA (Fig. 7)

- Inativação da enzima e precipitação das proteínas insolúveis em TCA a 6,25% (final 2,5%).
- Filtração comum através de papel filtro de filtração rápida.
- Diluição do filtrado, com água, numa relação 1:3
- Neutralização do ácido tricloroacético, no filtrado, com igual volume (com referência ao filtrado) de hidróxido de sódio 1N.

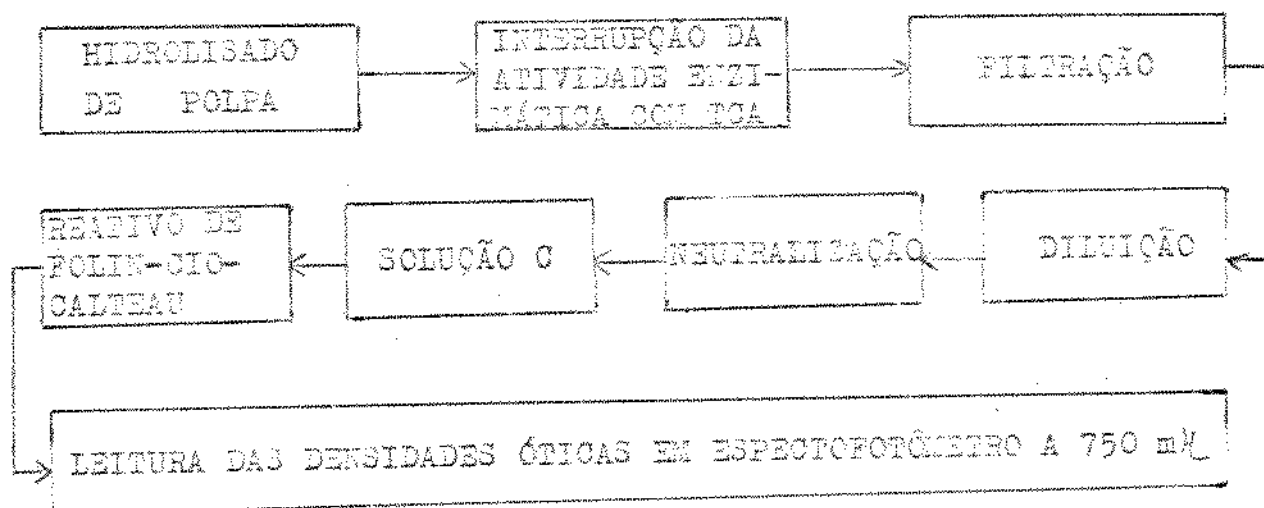


Fig. 7 - Fluxograma da avaliação da atividade enzimática pelo método de Lowry

#### 4.5 - AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ENZIMÁTICA

Realizada por método fotocolorimétrico, método de Lowry (17), com leitura das densidades óticas em espectrofotômetro a 750 m $\mu$ , e determinação da atividade enzimática em  $\mu$ g de Tirosina, com base na curva padrão de tirosina (Figura nº 8). Do valor obtido em cada tempo, foi descontado o valor do branco tempo zero. A atividade em  $\mu$ g de tirosina por ml de filtrado foi utilizada para a determinação da atividade específica, unidade enzimática por grama de proteína.

#### 4.6 - COMPOSIÇÃO QUÍMICA DA POLPA E DOS EXTRATOS

A unidade foi determinada segundo método A.O.A.C (1), proteínas pelo método Microkjedall, segundo A.O.A.C. (1), e gorduras pelo método de extração em Soxhlet, segundo A.O.A.C. (1).

#### 4.7 - PESO MOLECULAR DOS HIDROLISADOS

A avaliação do peso molecular dos hidrolisados foi efetuada por cromatografia de coluna, utilizando-se Sephadex G-50 (coarse) para a gel-filtração, nas seguintes condições: volume total da coluna igual a 50cc, amostras de 0,2 ml, frações coletadas de 3 ml, razão de fluir igual a 1,5 ml/min, eluente - tampão de Mollvaine pH 5,0 (18). As reações foram realizadas, utilizando-se enzimas do sobrenadante dos órgãos digestivos da corvina, e, como substrato, albumina bovina (Figura nº 9).

Foram realizados cromatogramas de hidrolisados de albumina por enzimas do sobrenadante do extrato do estômago e de hidrolisados de albumina por enzimas do sobrenadante do extrato do estômago, intestino, fígado e ceco pilórico, sendo a hidrólise pelo estômago efetuada na faixa ácida, continuada por incubação com os órgãos restantes na faixa alcalina.

Para obtenção dos hidrolisados de albumina bovina procedeu-se à incubação com o sobrenadante do extrato do estômago,

em reator enzimático, nas seguintes condições:  $[S]$  = solução de albumina bovina a 1%,  $[E]$  = 50% proteína do extrato bruto/proteína do substrato, temperatura: 40°C, tempo: 30, 60 e 120 minutos, pH 3.

A interrupção da atividade enzimática foi efetuada simplesmente por trazer a mistura em incubação a valores de pH e de temperatura inadequados à atividade da enzima em questão, no caso do estômago a pH 7, utilizando-se hidróxido de sódio 1N e, imediatamente, levando ao "freezer" a -25°C.

O hidrolisado de albumina bovina obtido por 60 minutos de incubação com o sobrenadante do extrato do estômago foi, então, incubado com o sobrenadante do extrato dos órgãos intestino, fígado e ceco pilórico, nas condições de pH e de temperatura adequados à atividade do extrato, ou seja, a pH 9 a 45°C por 30 minutos e por 2 horas, resultando em um tempo de hidrólise total de, respectivamente, 1 hora e 30 minutos e 3 horas.

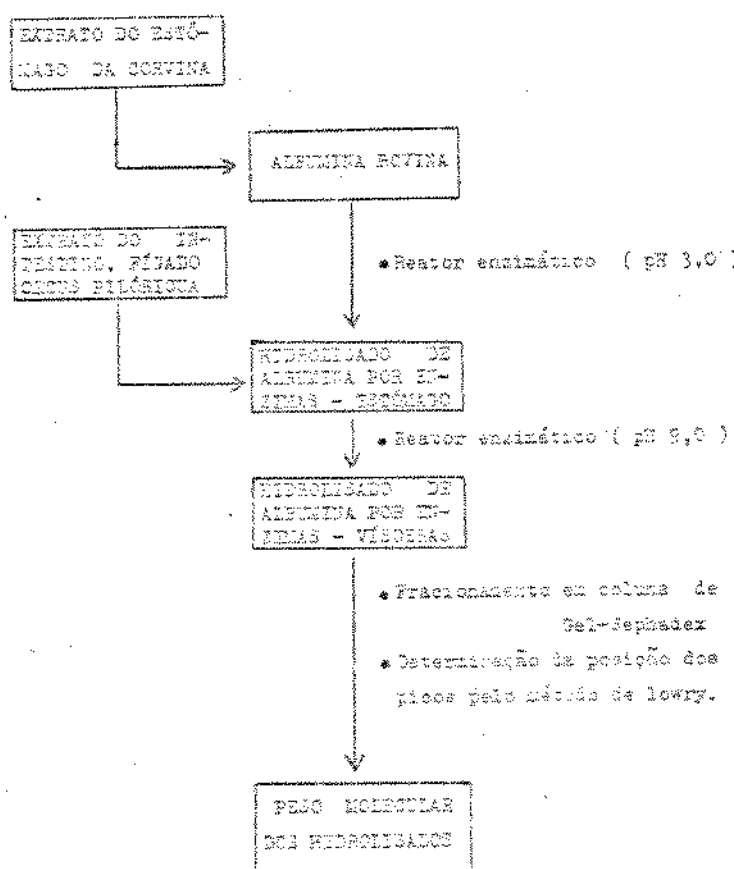


Fig. 3 - Fluxograma da determinação do peso molecular dos hidrolisados de albumina bovina pelas vísceras da corvina.

#### 4.8 - MATERIAL

##### 4.8.1 - Equipamentos

Reator enzimático termostatado por circulador de água a temperatura constante, espectrofotômetro Spectracon 350, potenciômetro, agitador magnético, estufa, dessecador, aparelho para micro-kjedall, homogeneizador tipo wiring-Blender, centrífuga, coluna para gel-filtração, máquina separadora de ossos e pele marca Deboning Bibbun, vidrarias e outros materiais comuns de laboratório

##### 4.8.2 - Produtos

Tartarato de sódio e potássio, sulfato de cobre, hidróxido de sódio, carbonato de sódio anidro, ácido sulfúrico concentrado, ácido clorídrico concentrado, sulfato de potássio, selênio, éter de petróleo, ácido tricloroacético, L-tirceína, cloreto de potássio, fosfato dissódico, ácido cítrico, glicina, cloreto de sódio, todos produtos para análise, dos laboratórios Merck, E. I. du Pont de Nemours and Co., Carlo Erba, Reagen, Riedel de Haen, Baker e ainda reagentes de Folin Ciocalteu Merck, albumina de soro bovina Armour e tripsina Difco 1:250.

## 5 - RESULTADOS, DISCUSSÃO E CONCLUSÕES

### 5.1 - PROVAS DA EXISTÊNCIA DE ATIVIDADE ENZIMÁTICA PROTEOLÍTICA

#### 5.1.1 - Por determinação do peso molecular dos hidrolisados

Comparou-se o peso molecular da albumina bovina com o peso molecular de hidrolisados de albumina por enzimas do aparelho digestivo da corvina, determinado por fracionamento em coluna de gel de Sephadex G-50 (coarse)

Foram realizados cromatogramas de hidrolisados de albumina bovina pelo estômago e de hidrolisados de albumina bovina pelo conjunto de vísceras, incluindo estômago, intestino, fígado e ceco pilórico, conforme detalhado em métodos, item 4.7. Para aferição foram realizados igualmente cromatograma de albumina bovina não hidrolisada e cromatograma de tirosina pura.

Na Figura nº 10, têm-se cromatogramas da mistura albumina bovina com sobrenadante do extrato do estômago, antes da reação de hidrólise (A), cromatograma de hidrolisado de albumina bovina pelo sobrenadante do extrato do estômago, por 30, 60 e 120 minutos (respectivamente  $B_1$ ,  $B_2$  e  $B_3$ ) e cromatograma da tirosina pura (D). Pode-se observar que o hidrolisado constituiu-se de uma mistura de peptídios de diversos pesos moleculares. O resultado coincide com o indicado em literatura quando a hidrólise é efetuada por pepsina comercial: "A pepsina hidrolisa 10% dos enlaces peptídicos e, segundo a duração do ataque, o hidrolisado apresenta peso molecular entre 600 e 3 000 (16).

Observou-se que não há praticamente avanço na hidrólise após 30 minutos de incubação nas condições do experimento, demonstrando que já aos 30 minutos se obtém máxima hidrólise pelo estômago e não compensa efetuar a hidrólise em tempo superior a esse.

Concluiu-se que o peso molecular da albumina bovina é 69 000, segundo Reurath e Bailey (19), e que o Sephadex G-50 (coarse) fraciona peptídeos de peso molecular compreendido entre 1 500 e 30 000, segundo instruções do fabricante (22), pode-se observar que a maioria das moléculas de albumina foram hidrolisadas a pesos moleculares menores de 30 000 e que há uma distribuição bastante regular, no hidrolisado, de peptídeos de diversos pesos moleculares.

Na Figura nº 11, tem-se cromatograma da mistura de albumina bovina e de sclerenadante do estômago, antes da reação de hidrólise (A), cromatograma de hidrolisado de albumina pelo estômago (B) e cromatograma de hidrolisado de albumina pelo estômago, seguido de hidrólise por intestino, fígado e ceco pilórico (C), cromatograma de tirosina pura (D).

Observou-se que há um avanço acentuado na hidrólise quando o hidrolisado pelo estômago é reincubado por uma mistura de enzimas do sobrenadante do intestino, fígado e ceco pilórico. O observado está de acordo com o esperado, uma vez que no estômago tem lugar o início da digestão das proteínas (24), continuando no intestino por enzimas provavelmente secretadas pelo intestino, fígado e ceco pilórico. Segundo Hawk (9), as aminopeptidases da mucosa intestinal agem nos produtos da digestão péptica e triptíca. Era de se esperar, portanto, que as enzimas do extrato do estômago efetuassem a hidrólise das proteínas até certo ponto, quando, então, se tornam substrato para enzimas do intestino, fígado e ceco pilórico. Segundo López (16), os produtos da hidrólise péptica são, em geral, mesclas de peptídeos com pequenas quantidades de aminoácidos, que logo são desdobrados pela tripsina e por outras enzimas.

Foi possível observar que o hidrolisado final efetuado pelo estômago a pH 3 seguido por hidrólise pelo intestino, fígado e ceco pilórico a pH 9 é constituído por peptídios de peso molecular bastante mais próximo a 1 500 que a 30 000. Aqui se nota que a variação em pesos moleculares dos peptídios no hidrolisado é bastante menor que a obtida pela hidrólise apenas pelo estômago.

Na Figura nº 12, em A, tem-se cromatograma da mistura albumina bovina e sobrenadante do extrato do estômago, antes da reação de hidrólise. Em C<sub>1</sub> e C<sub>2</sub>, respectivamente, cromatograma do hidrolisado de albumina pelo extrato constituído por estômago, intestino, fígado e ceco pilórico, por 90 e 180 minutos (sendo 60 minutos correspondentes à hidrólise pelo estômago). Pode-se observar que não há avanço no grau de hidrólise de 90 para 180 minutos, concluindo-se que não há vantagem de prosseguir a reação por mais de 90 minutos.

#### 5.1.2 - Por comparação com a atividade proteolítica da tripsina comercial

Comparou-se a atividade proteolítica de um extrato composto por órgãos que apresentam elevada atividade proteolítica na faixa alcalina (intestino, fígado e ceco pilórico) e a atividade proteolítica do sobrenadante desse extrato com a atividade proteolítica da tripsina comercial Difco 1:250.

O experimento foi realizado em três repetições, com vísceras de 40 corvinas de pesca industrial, tendo sido os extratos preparados conforme processo exposto em métodos tópicos 4.2 e armazenados por 4 meses em "freezer" a -25°C.

As reações foram realizadas nas seguintes condições: [S] = 1% proteína, [E] = 0,2% proteína do extrato/proteína da polpa, pH 9, temperatura = 45°C, tempo 15, 30, 45 e 60 minutos.

Para obtenção do sobrenadante do extrato de vísceras, procedeu-se à centrifugação do extrato por 15 minutos, a 500 X g.

O experimento foi conduzido de modo que, em cada repetição, se utilizaram alíquotas de uma mesma solução de polpa, sendo o sistema incubado com a enzima em um mesmo banho regulado por termostato, e as reações realizadas simultaneamente.

Verificou-se (Tabela VI) que o extrato bruto apresentou 17% da atividade proteolítica da tripsina comercial, e o sobrenadante, 30% dessa atividade. A comparação foi feita em 1 hora de reação, por tratar-se de valor de maior utilidade prática que o tempo correspondente à velocidade inicial. Siluwiski et alii (56) realizaram trabalhos de purificação, comparando a atividade das diversas frações do extrato, em 4 horas de reação.

#### 5.1.3 - Por comparação com a atividade proteolítica do músculo

Comparou-se a atividade proteolítica das vísceras com a atividade proteolítica do músculo da corvina, a fim de se verificar se a ação proteolítica provinha das vísceras da corvina ou da polpa.

Essa comparação foi realizada em seis repetições e nas seguintes condições de reação, quanto à concentração de substrato e enzima:  $[S] = 1\%$  proteína da polpa,  $[E] = 50\%$  proteína do extrato/proteína da polpa.

Avaliou-se a atividade proteolítica da polpa por dois procedimentos:

a) Utilizando-se nas reações enzimáticas extratos de vísceras submetidas previamente a fervura, por três minutos. O experimento foi realizado avaliando-se a atividade proteolítica das vísceras e a atividade proteolítica da polpa, em 15 minutos de reação, a cada valor de pH compreendido entre pH 2 e pH 11 e a 50°C. O estudo foi realizado em seis repetições, utilizando-se, em cada repetição, um lote de vinte espécimens de corvinas recolhidas da carga de diferentes barcos de pesca industrial e de pesca artesanal, tendo sido o gráfico construído com a média dos

valores obtidos nas seis repetições (Figura nº 13).

Observou-se que a atividade proteolítica dos músculos de corvina é bastante pequena, comparada com a atividade proteolítica das vísceras.

b) Substituiu-se, nas reações enzimáticas, a enzima por solução tampão (branco de enzima). O experimento foi realizado avaliando-se a atividade proteolítica das vísceras nas condições ótimas de pH (3, 7 e 9) e de temperatura e a atividade proteolítica da polpa nos mesmos valores de pH e a 45°C. O gráfico foi construído com a média dos resultados obtidos (Figura nº 14).

O estudo foi realizado com um lote de 40 espécimens de corvinas de pesca industrial. Outra vez foi possível observar a baixa atividade proteolítica do músculo, comparada com a atividade proteolítica das vísceras.

A literatura informa que o músculo de peixe experimenta autólise mais rapidamente que músculo de mamíferos, o que geralmente é atribuído a maior atividade catépsínica do músculo do peixe. Aqui verificamos que a atividade proteolítica das vísceras é bastante superior à atividade proteolítica do músculo do peixe, o que pode servir como indicador da grande atividade proteolítica das vísceras.

Concluiu-se que, quando a polpa é incubada com o extrato das vísceras, é especialmente hidrolizada por enzimas das vísceras e não por enzimas da polpa.

Devido a que 1/3 da proteína em reação, quando esta é realizada na concentração de enzimas de 50% proteína do extrato/proteína da polpa, é proveniente do próprio extrato de vísceras, tornou-se importante avaliar o grau de autólise experimental da polpa vísceras.

Para isso, comparou-se a atividade proteolítica das vísceras, tendo como substrato polpa de corvina, com a atividade proteolítica das mesmas, quando a solução de polpa é substituída por solução tampão (branco de polpa), o que representa o grau de

hidrólise das vísceras.

O estudo foi realizado com os extratos do estômago e do intestino, em condições de pH e temperatura ótimas para a sua atividade (Figuras 15 e 16).

Verificou-se que as proteínas da polpa são muito mais facilmente hidrolisáveis que as proteínas das vísceras, o que significa que a eliminação de 1/3 do substrato, quando se faz a reação para obter o branco da enzima, não é significativa como causadora da queda no grau de hidrólise observada nessa reação.

## 5.2 - INFLUÊNCIA DO pH A TEMPERATURA CONSTANTE

O estudo do efeito do pH na atividade enzimática dos extratos de vísceras de corvina foi realizado em seis repetições, tendo-se utilizado, para cada repetição, um lote de vinte espécimes de corvina, recolhidas da carga de diferentes barcos da pesca industrial e artesanal, conforme mostra o gráfico.

Observou-se que as curvas correspondentes ao grau de hidrólise (Figura 17) avaliada em micrograma de tirosina produzida nos diversos valores de pH apresentam três zonas bastante nítidas, que incluem um pico de máxima atividade em relação à atividade nos valores de pH vizinhos. A primeira zona estende-se do pH 2 a 5 com um pico de maior atividade a pH 3, confirmada em todas as seis repetições; a segunda estende-se do pH 5 a 8 com um pico de maior atividade a pH 7, apenas não confirmada em uma repetição; a terceira zona estende-se do pH 8 a 11 com um pico de maior atividade a pH 9, apenas não confirmada em uma repetição.

Excluindo-se os valores extremos de pH, onde a atividade enzimática tende a zero, o valor de pH de menor atividade enzimática para o extrato do conjunto de vísceras é o pH 5.

Os três picos do gráfico demonstram que o extrato contém, pelo menos, três enzimas proteolíticas diferentes; contudo não dão indicação quanto ao número total de enzimas no extrato,

mostrando apenas que se tem um ou um grupo de enzimas do tipo das chamadas enzimas ácidas, tais como as catepsinas e pepsina, uma ou um grupo de enzimas, cujo pH ótimo está na zona neutra, tais como carboxipeptidase, glicil glicina hidrolase e uma ou grupo de enzimas denominadas alcalinas, como tripsina, quimotripsina e catepsinas alcalinas (Tabela V).

Observou-se que as enzimas digestivas de peixe obtido de barcos de pesca artesanal apresentaram atividades semelhantes às obtidas de peixes de pesca industrial (Figura 18), sendo que os valores obtidos para a atividade das vísceras da corvina de pesca artesanal (em experimento de apenas uma repetição) se aproximam bastante da média das atividades das vísceras da corvina de pesca industrial (em experimento de cinco repetições).

Isso parece demonstrar que não há necessidade de se prepararem os extratos imediatamente após a captura do peixe, desde que este seja mantido em gelo nos barcos de pesca até o desembarque e processamento. Maior número de repetições com corvinas obtidas da pesca artesanal poderá comprovar essa observação.

Na Figura 19 pode-se apreciar a influência de cada órgão na atividade enzimática do conjunto de vísceras da corvina nos valores de pH de máxima atividade nas três regiões, faixa ácida, zona neutra e faixa alcalina.

Esse estudo foi realizado em duas repetições, tendo-se utilizado para cada repetição um lote de 40 espécimes de corvina de pesca artesanal, sendo cada lote proveniente de uma captura. As vísceras foram tratadas conforme detalhado em método, item 3.2.2, tendo sido as reações enzimáticas realizadas no próprio dia do recebimento dos peixes, nos valores de pH 3, 7 e 9 e sob as demais condições de reação especificadas ao pé do gráfico.

Observou-se que o principal órgão responsável pela atividade na faixa ácida é o estômago. O observado está de acordo com a literatura com referência a outros peixes. Kitamikado e

Tachino<sup>13</sup> encontraram uma protease ácida no estômago da truta arco-íris. Kenyon (14) refere-se a uma atividade péptica do estômago de várias espécies de peixes: "carp", "bluegill", "crapie", "pickerel" e "white bass". A presença de catepsinas no estômago de vários animais, incluindo espécies de peixes, tem sido estabelecida por Bucks<sup>14</sup>.

Observou-se que os órgãos restantes apresentaram atividades na faixa ácida, embora em menor grau que na zona neutra e na faixa alcalina.

Os órgãos responsáveis pela atividade na faixa alcalina e zona neutra são o intestino, o fígado e o ceco pilórico. Isso significa a possibilidade de nesses órgãos serem secretados ou neles serem lançadas tais enzimas, como tripsina, quimotripsina, carboxipeptidases, etc. (Tabela V). O resultado está de acordo com o encontrado em literatura para outros peixes. Kenyon (14) encontrou atividade triptica de extrato de pâncreas e hepatopâncreas da "carp", de intestino de "pickerel" e de ceco pilórico da "carppie".

Johnston (11) verificou que as enzimas proteolíticas do ceco pilórico do bacalhau exercem seu maior efeito a um valor de pH semelhante ao do ótimo para a tripsina. Croston (3) encontrou duas atividades tripticas de extratos de ceco pilórico de salmão, bastante semelhante à da tripsina e da quimotripsina dos mamíferos, tendo o pH 9 como ótimo para sua atividade. Conforme Hamoir (8), o ceco pilórico dos peixes tem função semelhante à do pâncreas dos mamíferos, sendo importante fonte de enzimas tripticas.

Considerando-se cada órgão, observou-se que, enquanto intestino, fígado e ceco pilórico apresentam atividades nos três valores de pH estudados, o estômago não tem atividade na faixa alcalina ou na zona neutra.

---

13 - KITAHAKADO, M & TACHINO, S. Digestive Enzymes of Rainbow Trout, apud PHILIPS, Jr., A.M., 1969.

14 - BUCKS, S. Z. Vergleich Physiol., apud HAMOIR, G. 1955.

### 3.3 - INFLUÊNCIA DA TEMPERATURA A pH CONSTANTE

O estudo do efeito da temperatura na atividade enzimática proteolítica das vísceras de corvina foi realizado utilizando-se um lote de 40 espécimes de corvina de pesca industrial.

Os extratos enzimáticos preparados como indicado em métodos, anexo 4.2, foram armazenados em "freezer" a -25°C, por cerca de dois meses.

Em um primeiro experimento, realizamos a reação nas seguintes condições:

[S] = 1% proteína de polpa, [E] = 50% proteína do extrato/proteína de polpa, pH = o valor ótimo para atividade proteolítica do órgão em estudo, determinado em 3.4, tempo: até 2 horas de reação, com tomada de amostras a cada 15 minutos.

Base primeiro experimento (Figuras 20 e 21) evidenciou que, nas condições de reação, há aumento no grau de hidrólise após 45 minutos de reação. Com o fim de verificar as hipóteses expostas de explicar o fenômeno, vaiis como:

- esgotamento do substrato,
- desnaturação da proteína enzimática,
- inibição da reação enzimática, por produtos da reação produzidos durante a reação,

procedeu-se a um segundo experimento, realizando-se as reações nas mesmas condições, porém realizando-se o extrato após a retirada da amostra correspondente ao tempo de 45 minutos.

Com esse experimento (Figuras 22 e 23) corroborou-se a primeira hipótese formulada, de que o "plateau" no gráfico das Figuras 20 e 21 é devido a esgotamento do substrato.

A reposição do substrato, neste segundo experimento, foi feita da maneira que a conservação do substrato passou a ser 2% de proteína de polpa. Imediatamente após a adição de mais polpa, foi retirada uma amostra que foi denominada amostra de controle simples, necessária porque a adição de mais polpa ao

fica a situação quanto às proteínas solúveis em TCA existentes na mistura em reação, de modo que nem a amostra tempo zero nem a amostra tempo 45 minutos pode servir de referência para avaliar o grau de hidrólise experimentado nos primeiros 15 minutos após a adição de mais polpa. Além dessa amostra de controle, procurou-se reconstituir uma situação onde se teriam condições de concentração de substrato e de enzimas idênticas àsquelas do momento exato da adição de mais polpa, porém em supostas condições de que a hidrólise não houvesse ocorrido. Essa amostra de controle chamou-se amostra de controle reconstituída e foi utilizada como branco tempo zero para as amostras retiradas após a reposição de polpa.

Cálculos<sup>15</sup>, tendo como referência uma e outra amostra de controle, deram origem a dois gráficos, tendo o primeiro como base a amostra de controle simples, e o segundo a amostra de controle reconstituída.

Observou-se que as duas amostras de controle satisfizeram igualmente, pois os valores obtidos, tendo como referência uma ou outra, foram bastante semelhantes.

Para fins de facilitar a discussão, dividiu-se a reação em dois estágios, o primeiro antes da reposição do substrato, ou seja, nos primeiros 45 minutos de reação, e o segundo após a adição.

---

15 - Para se avaliar o grau de hidrólise após adição de mais polpa, realizou-se o seguinte cálculo:

- a) utilizando-se a amostra de controle simples: subtraíu-se o valor obtido em microgramas de tirosina encontrado para cada tempo do valor encontrado para a amostra de controle simples;
- b) utilizando-se amostra de controle reconstituída: subtraíu-se o valor obtido em micrograma de tirosina encontrado para cada tempo do valor obtido para a amostra de controle. Essa diferença representa quanto de proteína solúvel em ácido tricloroacético foi produzida no tempo decorrido após adição de polpa. Esse valor adicionado à quantidade de proteína solúvel em TCA nos primeiros 45 minutos de reação representa a quantidade total de proteína solúvel produzida do início da reação até cada tempo considerado.

Desse modo, o primeiro estágio da reação, a reação do substrato representa apenas uma reconstituição das condições iniciais quanto à concentração do substrato. Este será hidrolisado pelas enzimas exsintéticas numa proporção inversa ao grau de desnaturação experimental do por suas proteínas exsintéticas no primeiro estágio da reação.

Uma reação de 20% no grau de hidrólise no segundo estágio da reação se deve exclusivamente à reação na quantidade de enzima, devido às volumes de amostras correspondentes ao primeiro estágio da reação. A porcentagem dessa percentual representará o grau de desnaturação experimental pela enzima no primeiro estágio da reação.

Com base nessa observação, constatou-se que os gráficos obtidos no segundo experimento (Figuras 22, 23, 24, 25 e 26) se mostraram satisfatórios para se avaliar o grau de desnaturação experimental pela enzima nos primeiros 15 minutos da reação, bem como para dar indicação da temperatura ótima para a atividade exsintética dos órgãos digestivos da ocrina nas condições em estudo.

Considerando-se os resultados obtidos nas condições em estudo, verifica-se que:

a) a temperatura ótima para a atividade exsintética proteolítica do extrato do estômago, a pH 1, é um valor incluído no intervalo (30-40°C);

b) a temperatura ótima para a atividade exsintética proteolítica do extrato do intestino, tanto nas reações a pH 7 como nas reações a pH 9, estão na vizinhança de 50°C;

c) a temperatura ótima para a atividade proteolítica do extrato do fígado nas reações a pH 6, 7, 8 e 9, com concentração de substrato igual a 1% de proteína e um tempo de incubação de 15 minutos, é um valor do intervalo (40-50°C);

d) a temperatura ótima para a atividade exsintética proteolítica do extrato do ceco pilórico a pH 9 é um valor de inter-

valo (50-60°C);

e) nas reações com extrato estomacal a 60°C, a polpa adicionada no segundo estágio da reação não experimentou hidrólise, o que indica completa desnaturação do extrato estomacal no primeiro estágio da reação a essa temperatura;

f) o grau de desnaturação dos diversos órgãos na temperatura de 60°C, experimentado no primeiro estágio da reação, variou desde uma completa desnaturação do extrato enzimático como na reação do extrato estomacal a pH 3 (Fig.nº 22), até uma relativamente pequena desnaturação como a experimentada pelo extrato do intestino a pH 7 (Fig.nº 23) comparada com a experimentada pelos vários órgãos nos valores de pH 3 e 9 (Fig nº 22, 24, 25 e 26);

g) a diferença no grau de desnaturação entre as reações realizadas a pH 7 e as realizadas a pH 3 ou a pH 9, como exposto na observação anterior, provavelmente se deve às condições mais suaves de pH na zona neutra, enquanto a pH 3 e a pH 9 se têm condições drásticas de pH associado às condições drásticas de temperatura;

h) nas reações a 30 e a 40°C com extrato do intestino a pH 9 não houve aumento brusco no grau de hidrólise pela reposição de substrato, o que foi atribuído ao fato de a referida reposição ter sido efetuada em um momento em que toda enzima estava saturada com o substrato, pois, conforme indica a literatura, um aumento na concentração do substrato influi na velocidade da reação, primeiro rapidamente e depois lentamente, até o momento em que toda a enzima está saturada com o substrato, quando, então, a velocidade da reação é independente de qualquer aumento na concentração do substrato (4);

i) nas reações a 60°C com extrato do intestino a pH 9 não houve aumento brusco no grau de hidrólise pela reposição de substrato, o que foi atribuído ao elevado grau de desnaturação experimentado pela enzima no primeiro estágio da reação;

3) ocorreu espantoso processo de substrato nas reações a pH 9 com extrato de fígado, a 40 e a 50°C, não se justificando a reação em um tempo tão prolongado como a efetuada e, portanto, não cabendo indicar um valor de temperatura ótima para essas condições, uma vez que há um potencial enzimático do extrato que deixa de se manifestar unicamente por falta de substrato.

#### 5.4 - COMPARAÇÃO ENTRE A ATIVIDADE PROTEOLÍTICA DO EXTRATO DE VÍSCERAS DA CORVINA E A SOMA DA ATIVIDADE DOS ÓRGÃOS COMPONENTES

Foi realizada comparação entre a atividade proteolítica do conjunto de vísceras da corvina (estômago, intestino, fígado e ceco pilórico), que se denominou atividade global (G), e a soma da atividade proteolítica dos órgãos componentes (C).

Essa comparação tem por fim verificar se ocorre interação entre os vários órgãos com referência à atividade proteolítica, o que pode significar vantagem de se realizarem as reações enzimáticas, inclusive com presença de órgãos que apresentem baixa atividade enzimática.

Se a referida interação não ocorre, veremos que a atividade global (G) será igual à soma das atividades dos órgãos componentes (C) e, portanto,  $G/C = 1$ .

Para determinar o valor de C, avaliou-se a atividade proteolítica de cada órgão individualmente, havendo-se calculado a média aritmética ponderada dos resultados obtidos, tendo como pesos o teor de participação de proteínas de cada órgão no conjunto de vísceras.

O estudo foi realizado com os dados obtidos no experimento exposto no subtópico 5.2, os quais foram origem aos gráficos da Figura nº 15.

Verificou-se em todos os casos um valor de  $G/C > 1$ , como mostra a Tabela VII, concluindo-se ou que há uma elevada con-

centração de enzimas na reação, ou que há uma interação entre os vários órgãos com respeito à atividade proteolítica, a qual pode ser devido aos seguintes fatores:

a) ação sinérgica entre as proteases de diversos órgãos, pois, segundo Hark (9), "há alguma evidência de ação sinérgica entre as várias endopeptidases, a ação de uma podendo descobrir um sítio previamente inacessível a outra";

b) ativação de zimógenos elaborados em um órgão, como por exemplo, a reação de ativação do tripsinógeno, pré-enzima elaborada pelo pâncreas, que é catalisada pela enterocquinase, enzima elaborada pelo intestino;

c) presença de substâncias em um órgão que agem como ativadores de enzimas de outro órgão.

Para confirmar essa interação será necessário realizar o estudo com mais baixa concentração de enzimas.

## 5.5 - COMPOSIÇÃO QUÍMICA DO MÚSCULO CONECTIVO E DAS VISCERAS DA CORVINA.

Determinou-se a composição química do músculo conectivo bem como do estômago, intestino, fígado e ceco pilórico, em todos os lotes de peixes recebidos para o estudo realizado no presente trabalho.

A determinação de proteínas foi feita com o objetivo de se prepararem as soluções de polpa e de extratos enzimáticos, já que a concentração foi expressa em termos de proteínas existentes em solução.

Os resultados estão contidos na tabela VIII. O teor de gordura da polpa de corvina indica que a espécie é um peixe da categoria A, segundo a classificação de Sargent e Elliott (26), ou seja, um peixe magro, com teor de gordura menor que 5%.

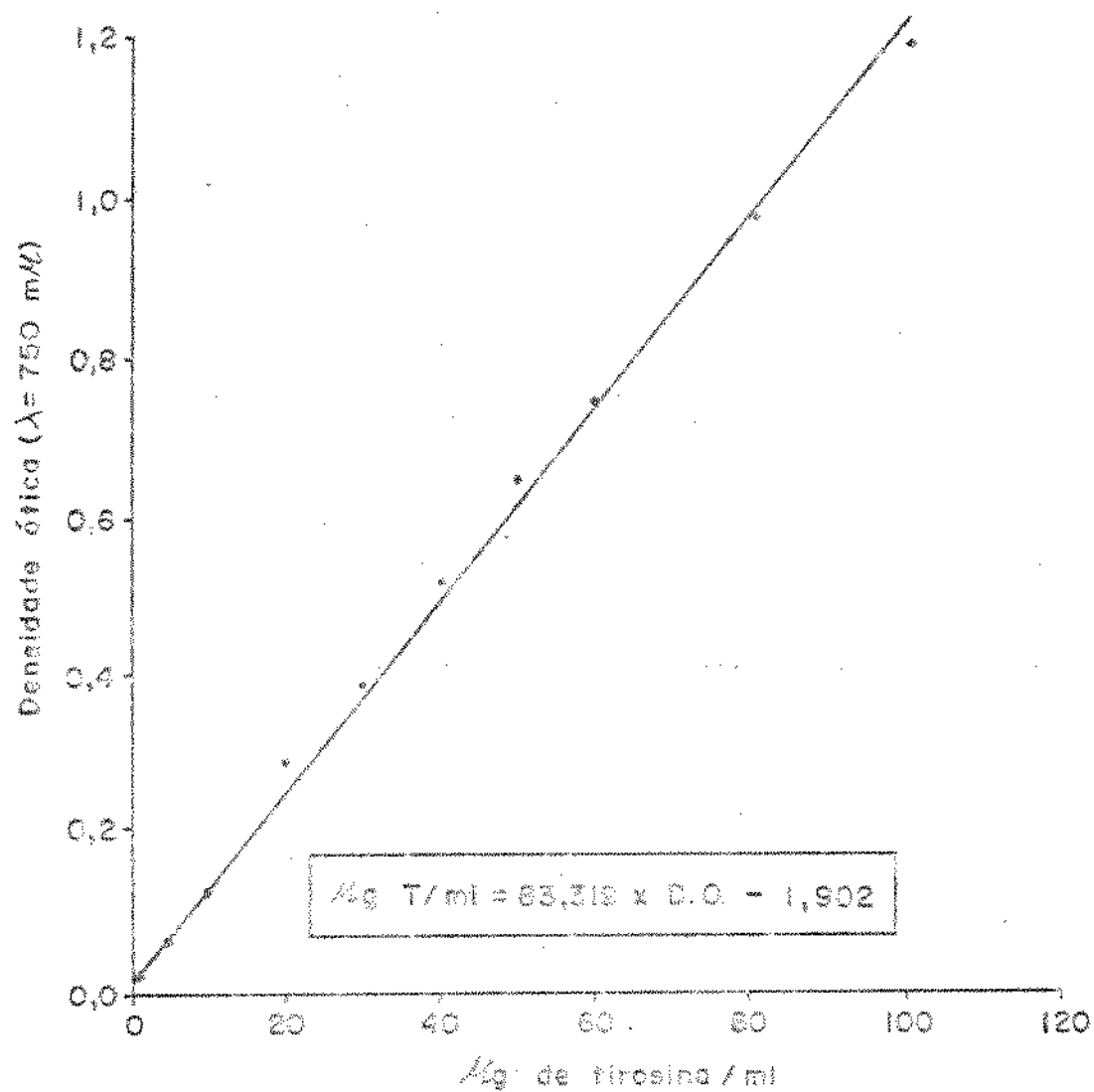


Fig. 8 - Curva padrão de tirosina (método de Lowry), Spectromon 360 ajustado pelo branco de reagentes

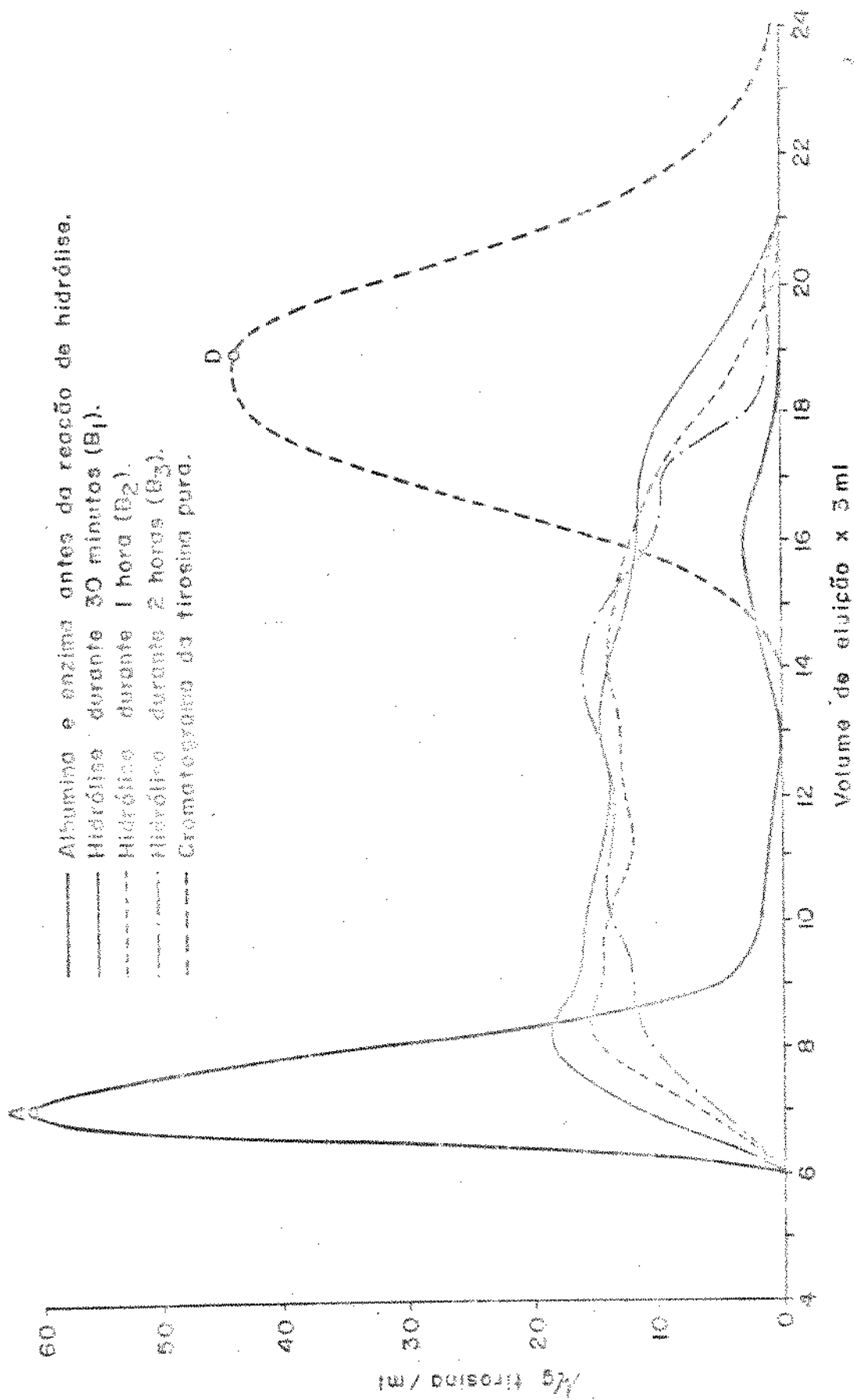


Fig. 10 - Estudo cromatográfico do hidrolisado de albumina bovina pelo estômago da corvina

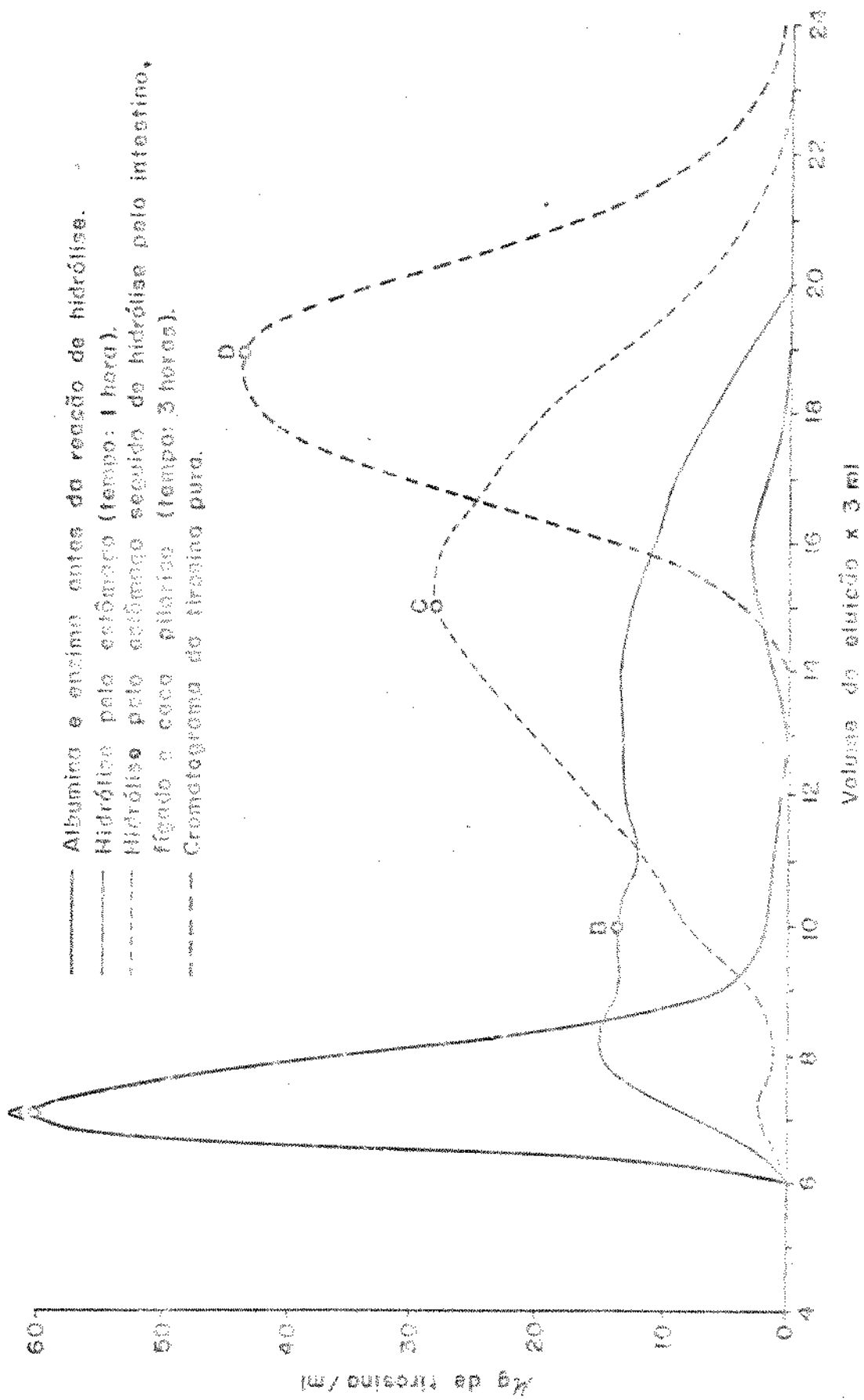


Fig. 11 - Estudo cromatografico do hidrolisado de albumina bovina por extratos de visceras de corvina

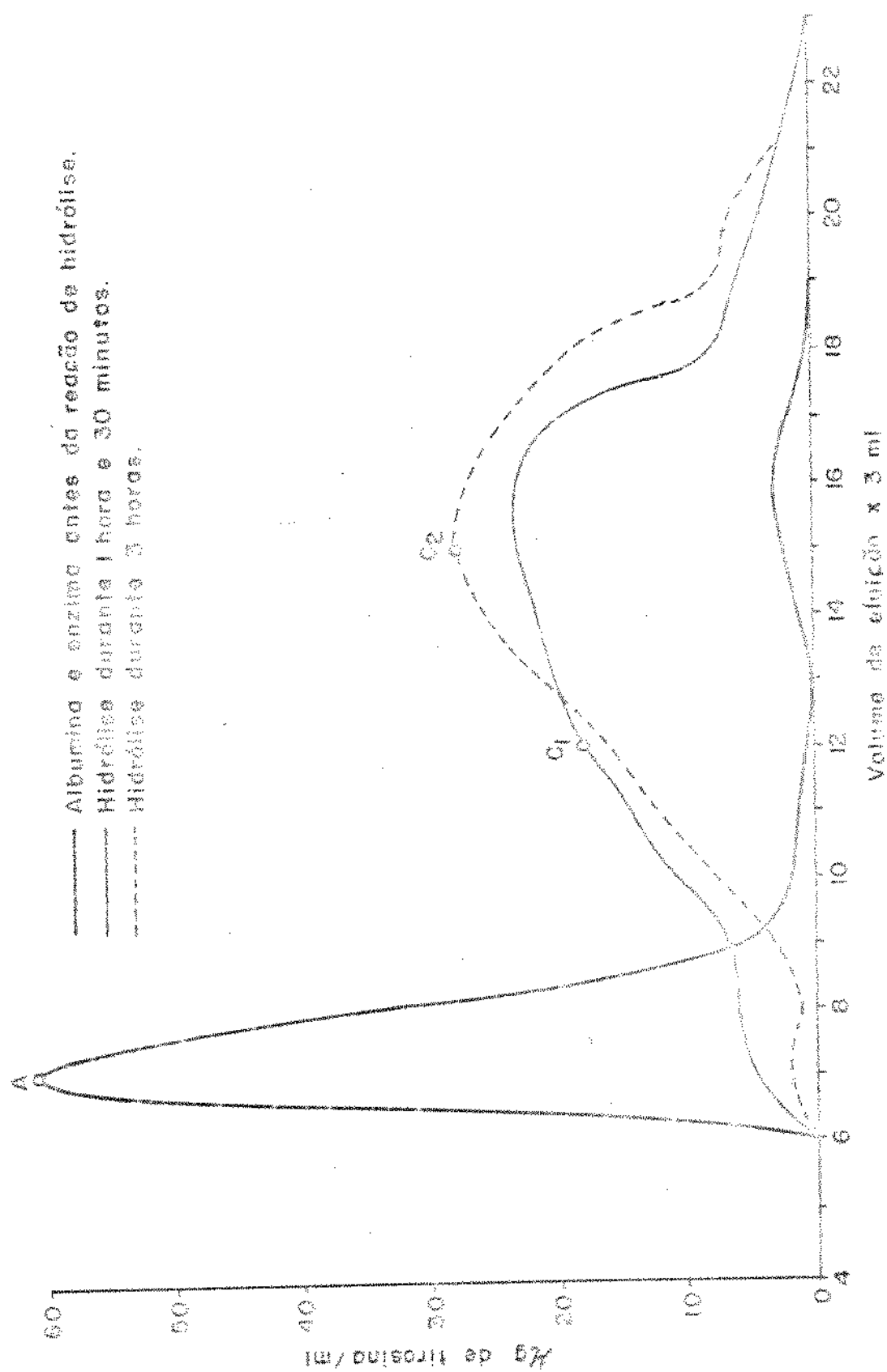
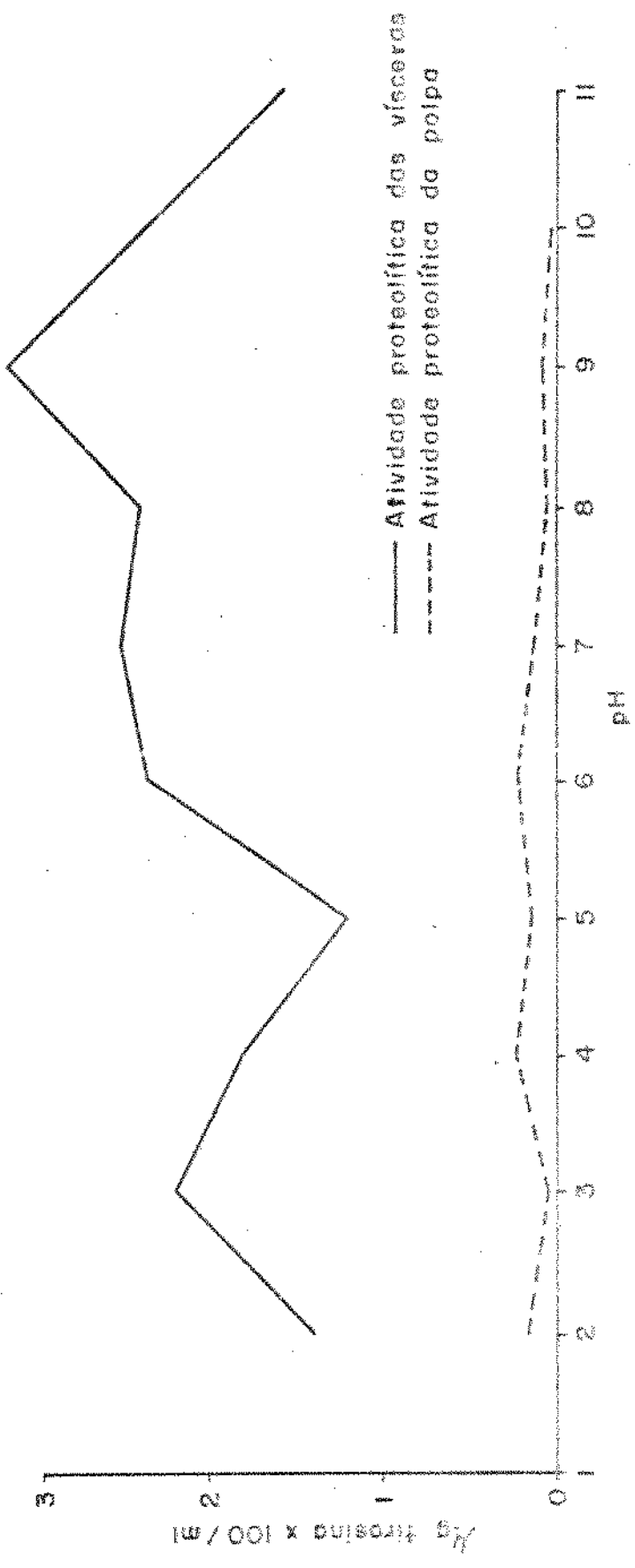
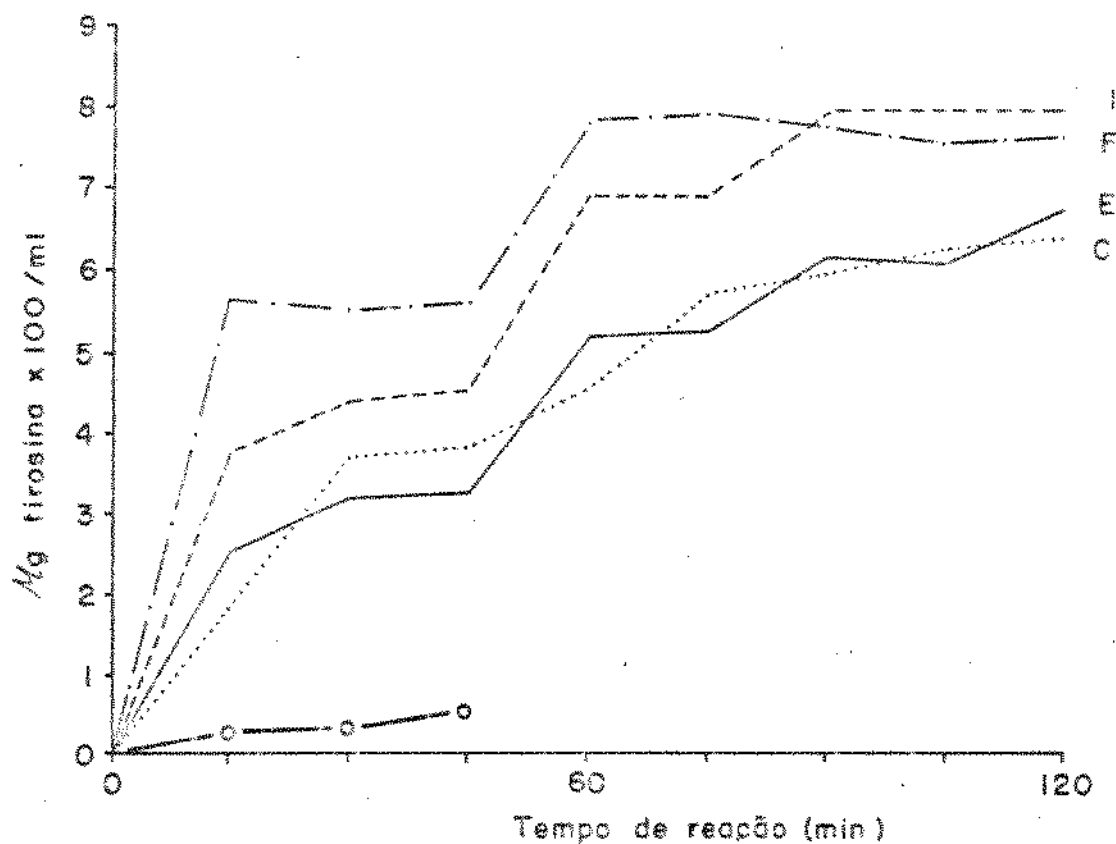


Fig. 12 - Estudo cromatográfico do hidrolisado de albumina bovina pelo estômago seguido por hidrólise por intestino, fígado e ceco pilórico



Condições de reação:  
[S] = 1% prot. polpa      [E] = 50% prot. extrato/prot. polpa  
T = 50°C ± 2              t = 15 minutos

Fig. 13 - Comparação entre a atividade proteolítica das vísceras e da polpa de corvina



Condições de reação:

[S] = 1% proteína da polpa, 2% após 45 minutos de reação

[E] = 50% proteína do extrato/proteína da polpa

Convenções:

E = Reação do extrato do estômago a pH 3 - 40°C

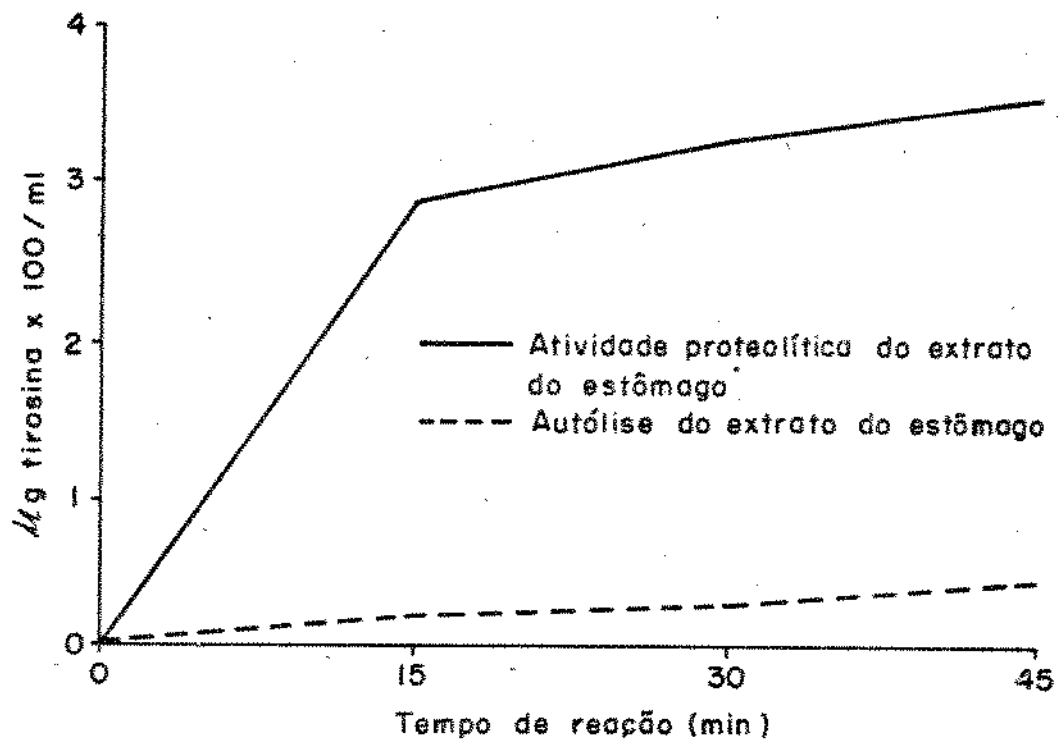
I = Reação do extrato do intestino a pH 9 - 50°C

F = Reação do extrato do fígado a pH 9 - 40°C

C = Reação do extrato do ceco pilórico a pH 9 - 50°C

o — o branco de enzima

Fig. 14 - Atividade enzimática dos extratos do estômago, do intestino, do fígado e do ceco pilórico da corvina nos valores de pH e de temperatura ótimos



Condições de reação:

[S] = 1% proteína da polpa

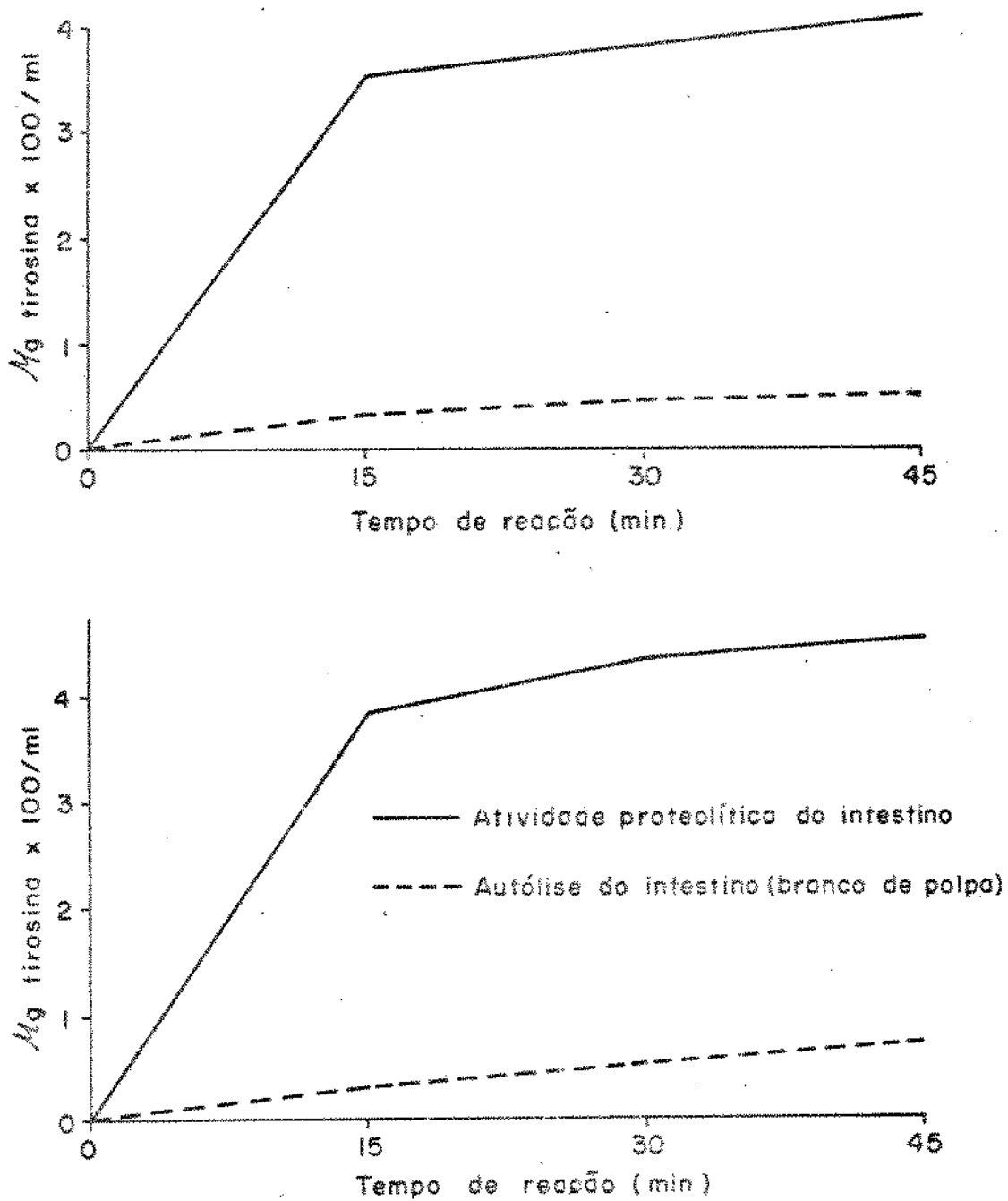
[E] = 50% proteína do extrato/proteína da polpa

pH = 3

Temperatura:  $40^{\circ}\text{C} \pm 2$

Tempo: 15, 30, 45min

Fig. 15 - Comparação entre a atividade proteolítica do estômago e a autólise experimentada pelo extrato nas mesmas condições:



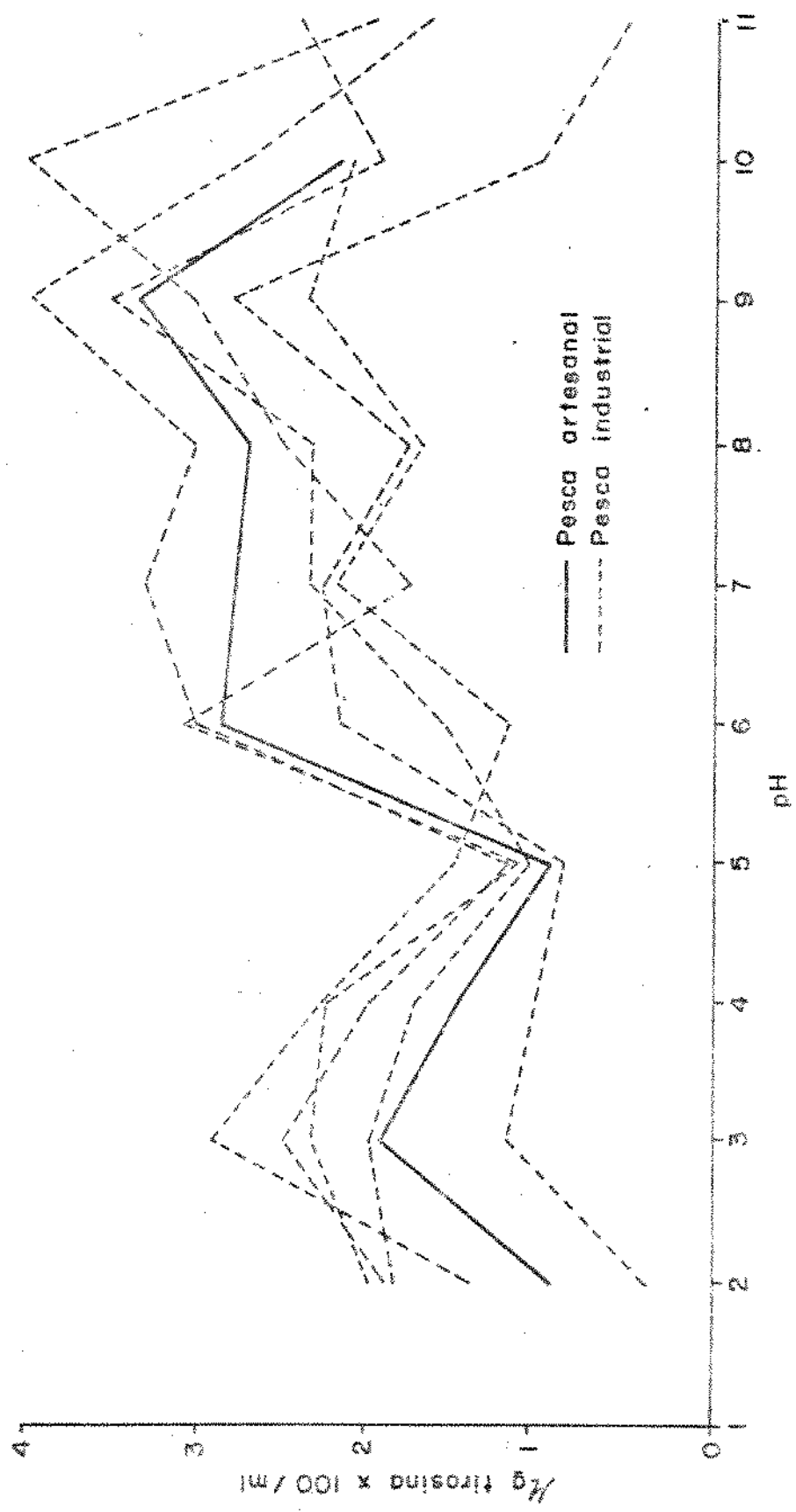
Condições de reação:

[S] = 1% proteína da polpa

[E] = 50% proteína do extrato/proteína da polpa

Temperatura:  $50^{\circ}\text{C} \pm 2$     pH 7 (em cima)    pH 9 (embaixo)

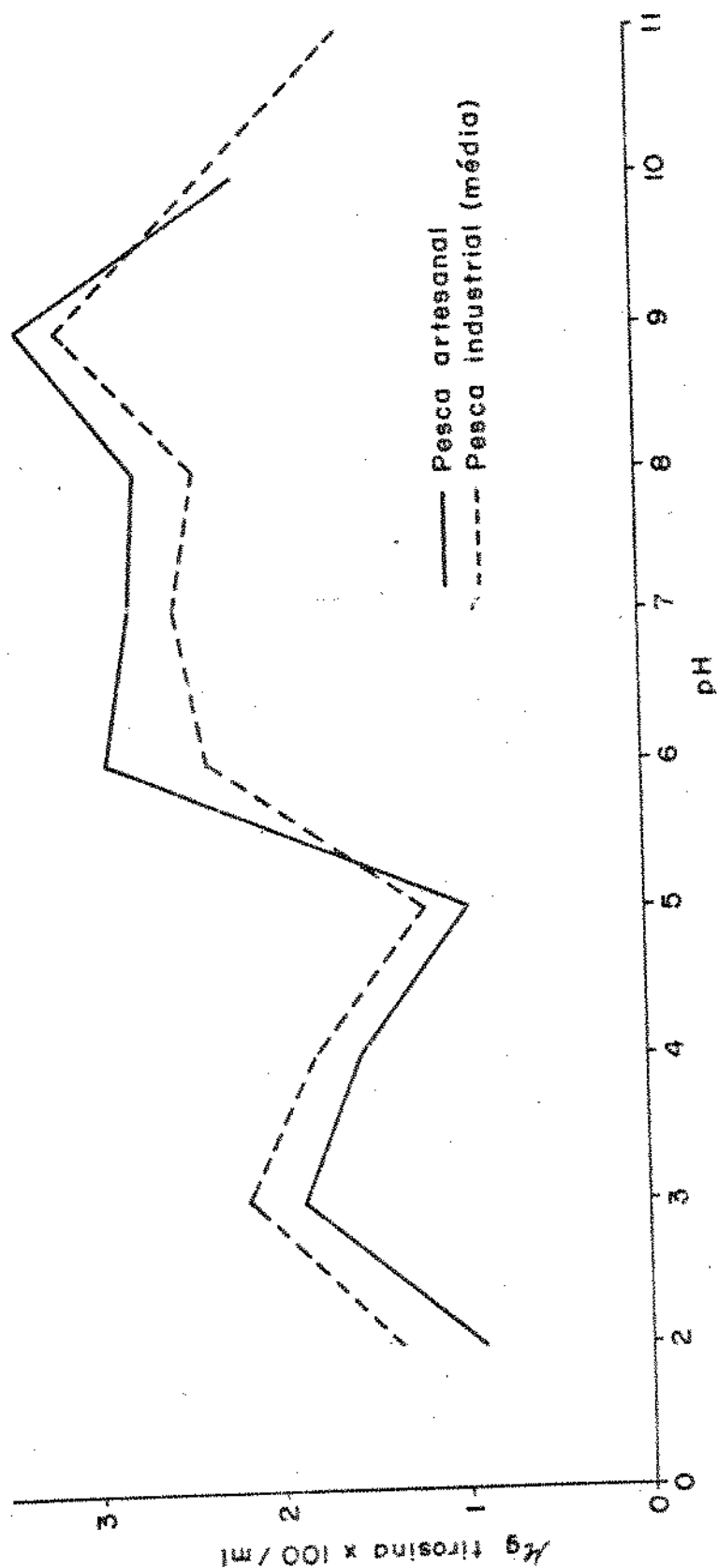
Fig. 16 - Comparação entre a atividade proteolítica do intestino da corvina e a autólise experimentada pelo extrato nas mesmas condições



Condições de reação:

$[S] = 1\%$  prot. da polpa     $[E] = 50\%$  prot. extrato/prot. polpa     $T = 50^{\circ}\text{C} \pm 2$      $t = 15 \text{ min}$

Fig. 17 - Influência do pH na atividade enzimática do extrato de vísceras



Condições de reação:

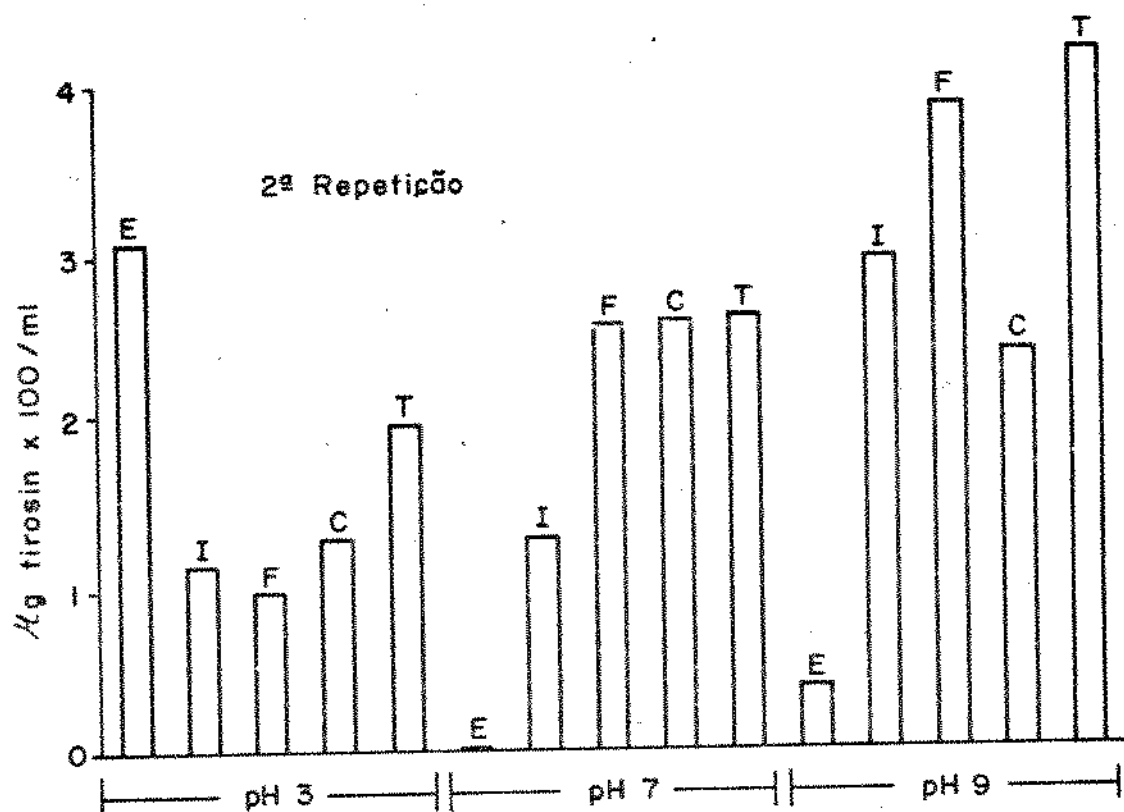
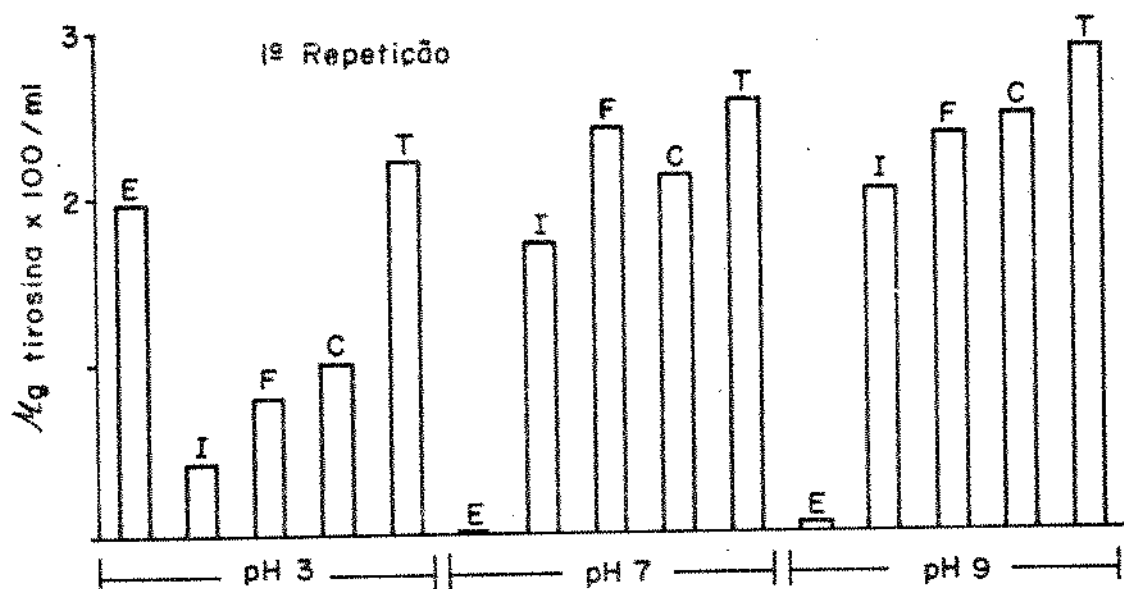
$[S] = 1\%$  proteína da polpa

$[E] = 50\%$  prot. extrato/prot. polpa

$T = 50^{\circ}\text{C} \pm 2$

$t = 15$  minutos

Fig. 18 - Comparação entre a atividade proteolítica de vísceras de corvina de pesca industrial e de pesca artesanal



Condições de reação:

[S] = 1% proteína da polpa

[E] = 50% prot. extrato/prot. polpa

T = 50°C ± 2 t = 15 min.

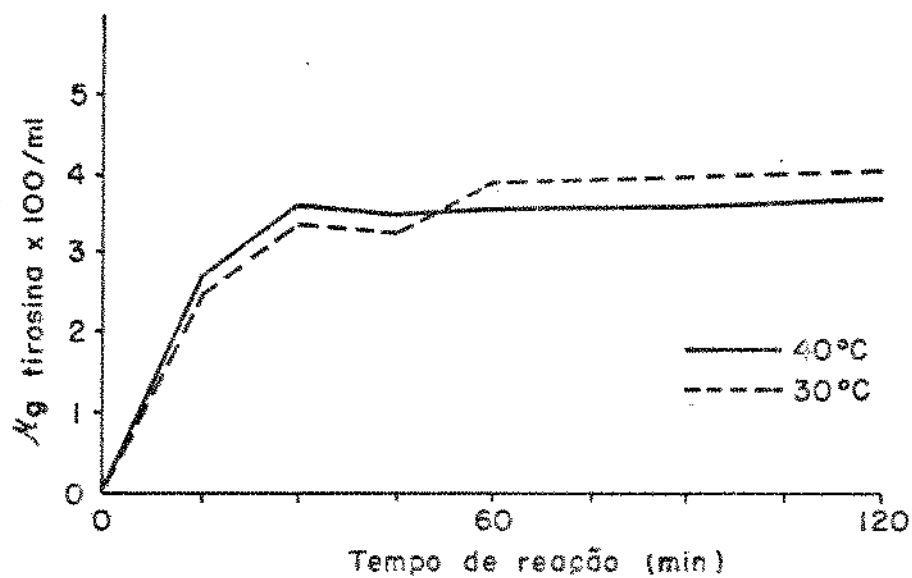
Convenções:

E = estômago I = intestino

F = fígado C = ceco pilórico

T = conjunto dos órgãos

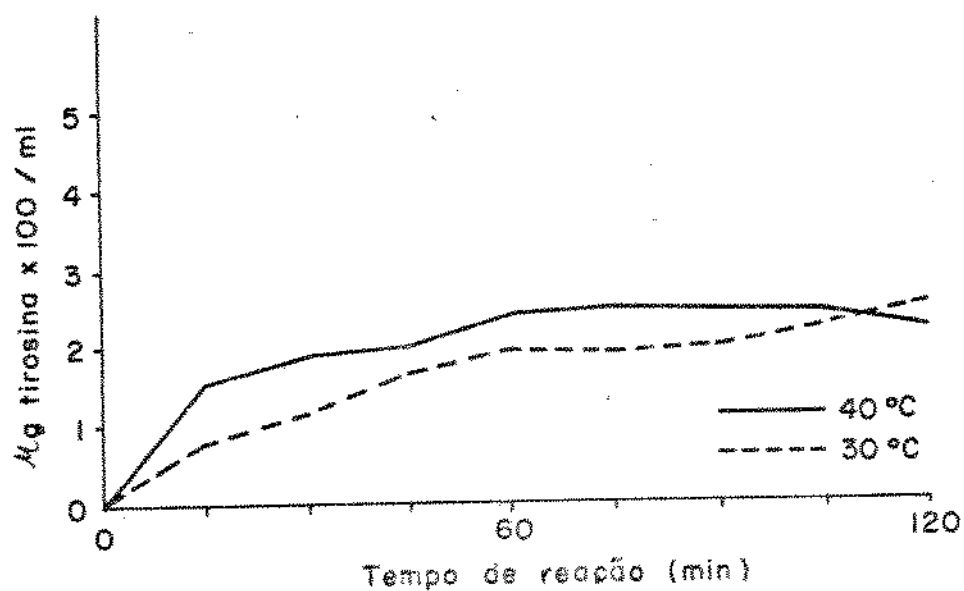
Fig. 19 - Órgãos responsáveis pela atividade enzimática do conjunto de vísceras de corvina, nos valores de pH de maior atividade.



Condições de reação: pH 3

[S] = 1% prot./polpa [E] = 50% prot. extrato/prot. polpa

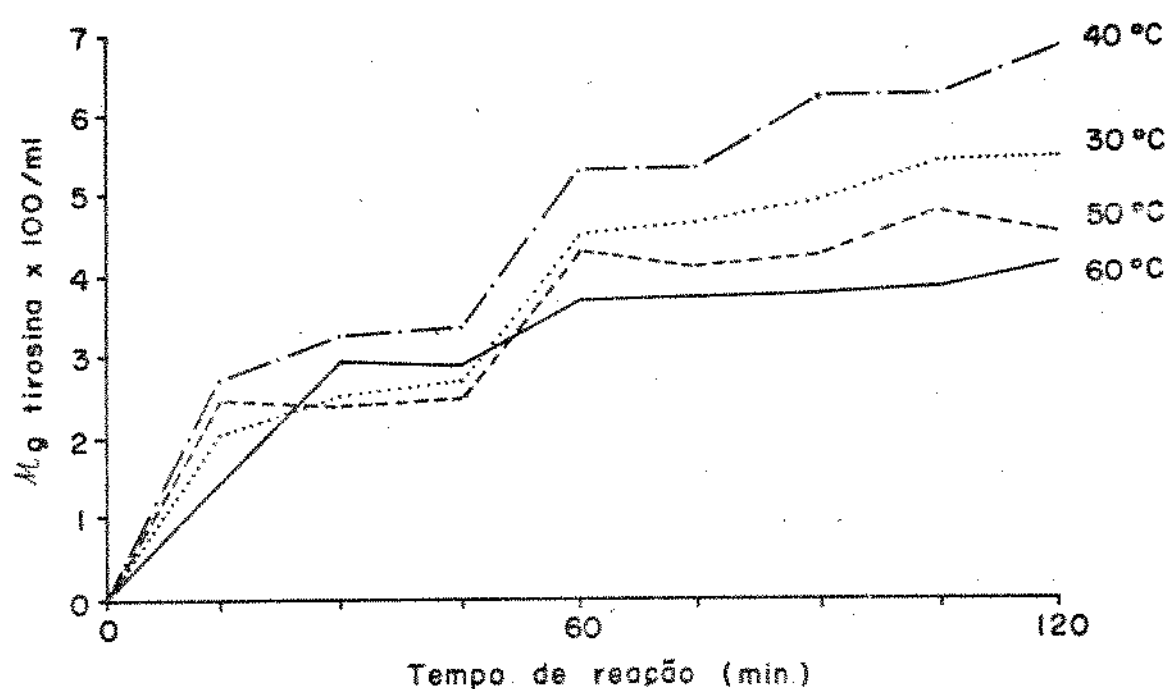
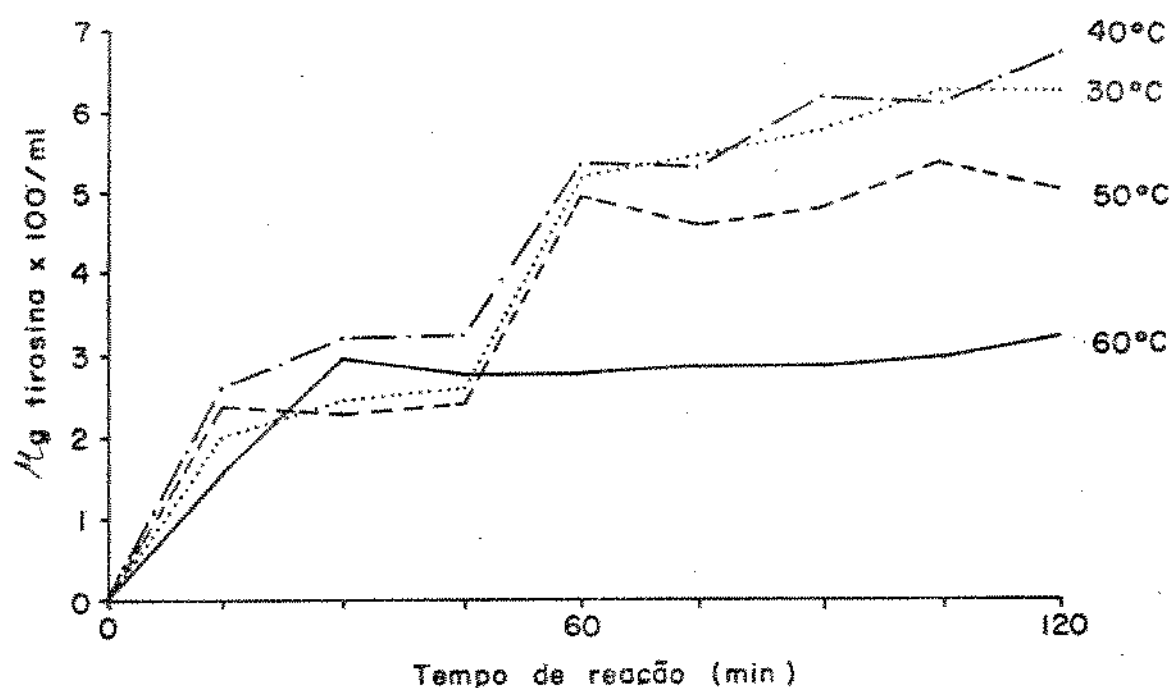
Fig. 20 - Efeito da temperatura na atividade enzimática do extrato do estômago da corvina.



Condições de reação: pH 7,0

[S] = 1% prot. polpa [E] = 50% prot. extrato/prot. polpa

Fig. 21 - Efeito da temperatura na atividade enzimática do intestino da corvina.

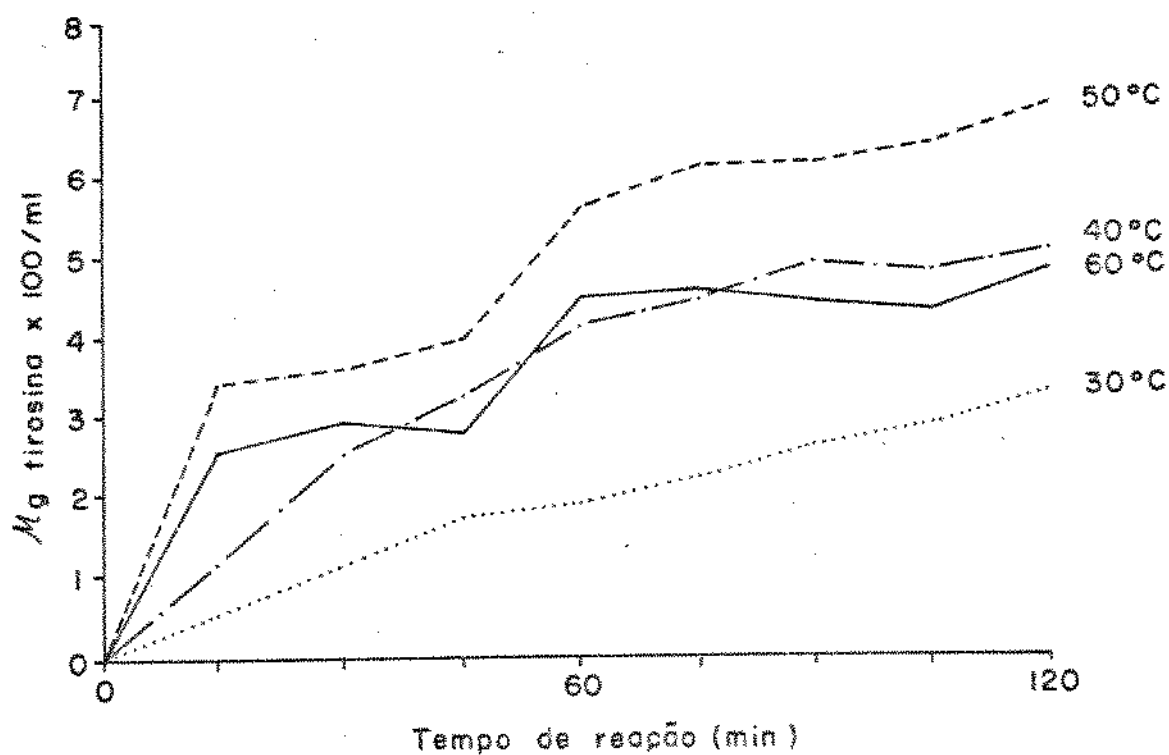
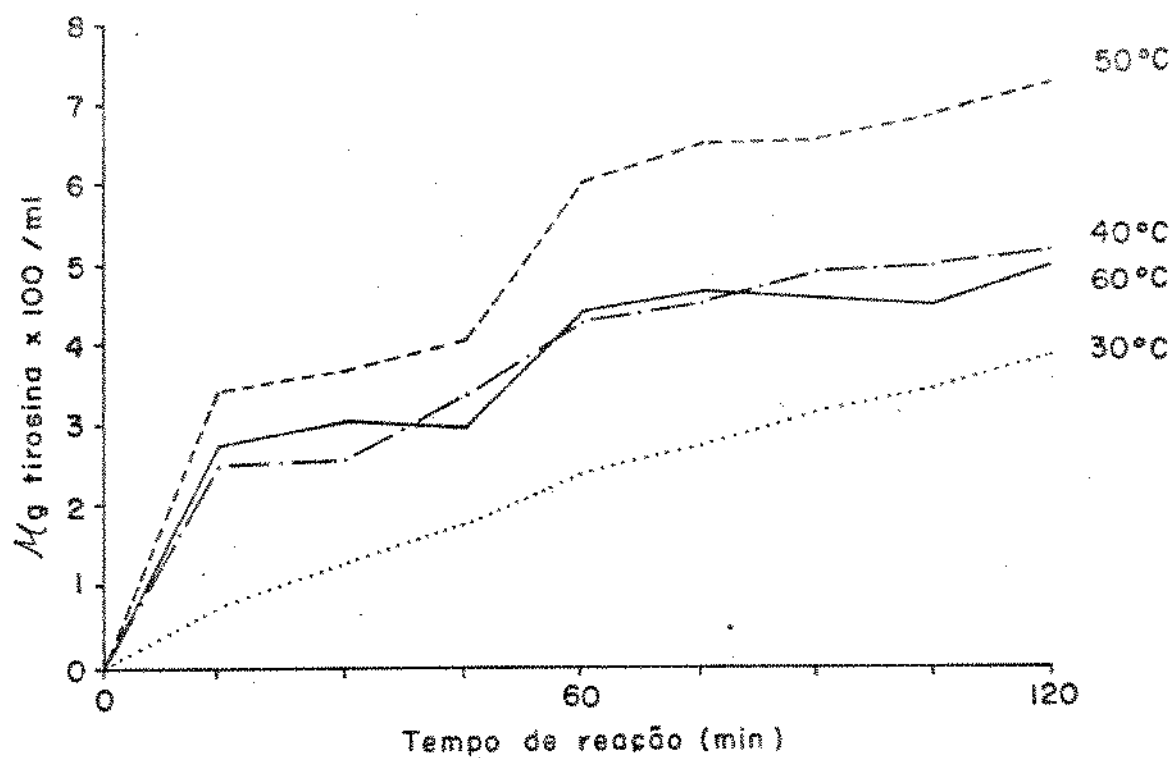


Condições de reação: pH 3,0

[S] = 1% proteína da polpa, 2% após 45 minutos de reação

[E] = 50% proteína extrato/proteína da polpa

Fig. 22 - Efeito da temperatura na atividade enzimática do extrato do estômago da corvina  
Em cima: obtido com amostra de controle simples.  
Embaixo: obtido com amostra de controle reconstituída.

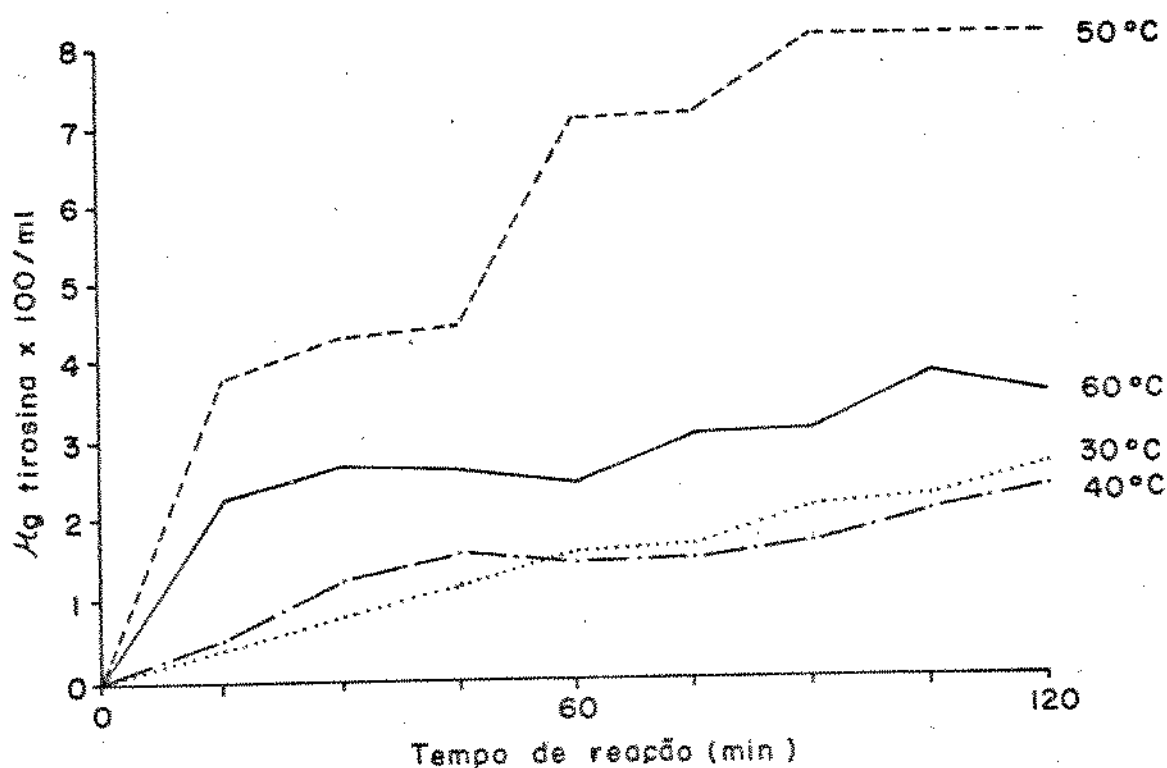
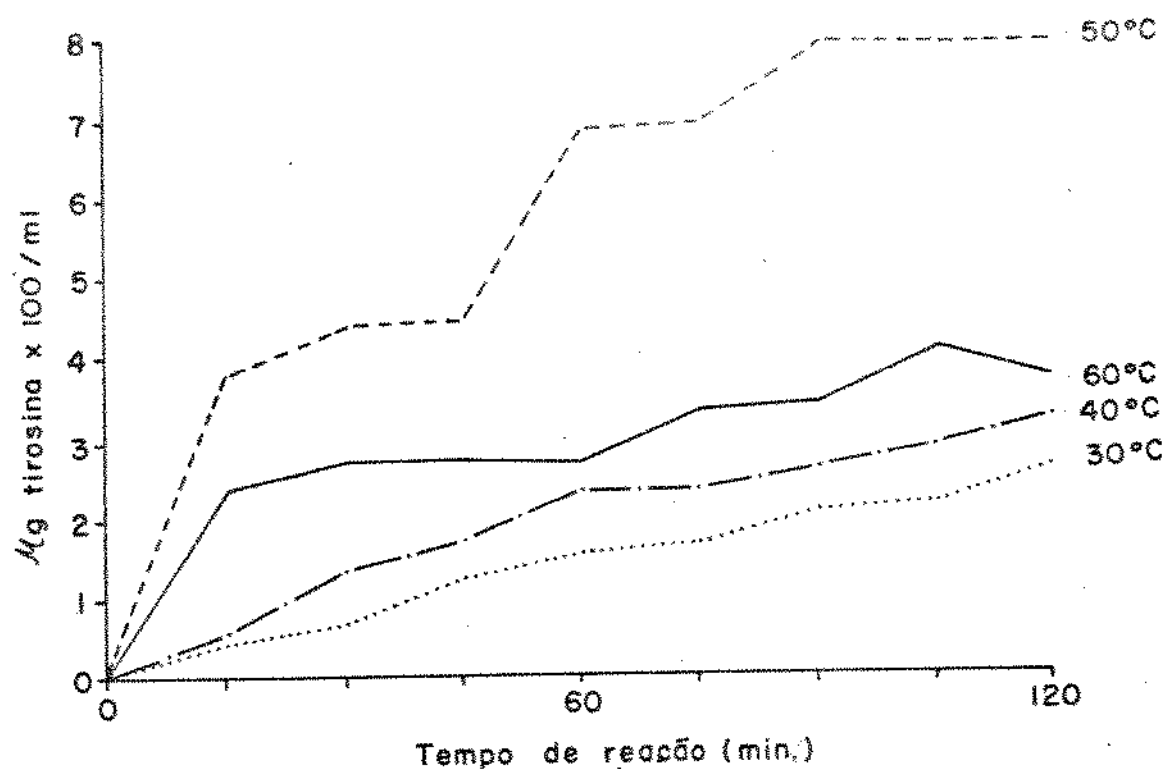


Condições de reação: pH 7,0

[S] = 1% prot. polpa, 2% após 45 min. de reação

[E] = 50% prot. extrato/prot. polpa

Fig. 23 - Efeito da temperatura na atividade enzimática do intestino da corvina  
Em cima: obtido com amostra de controle simples.  
Embaixo: obtido com amostra de controle reconstituída.

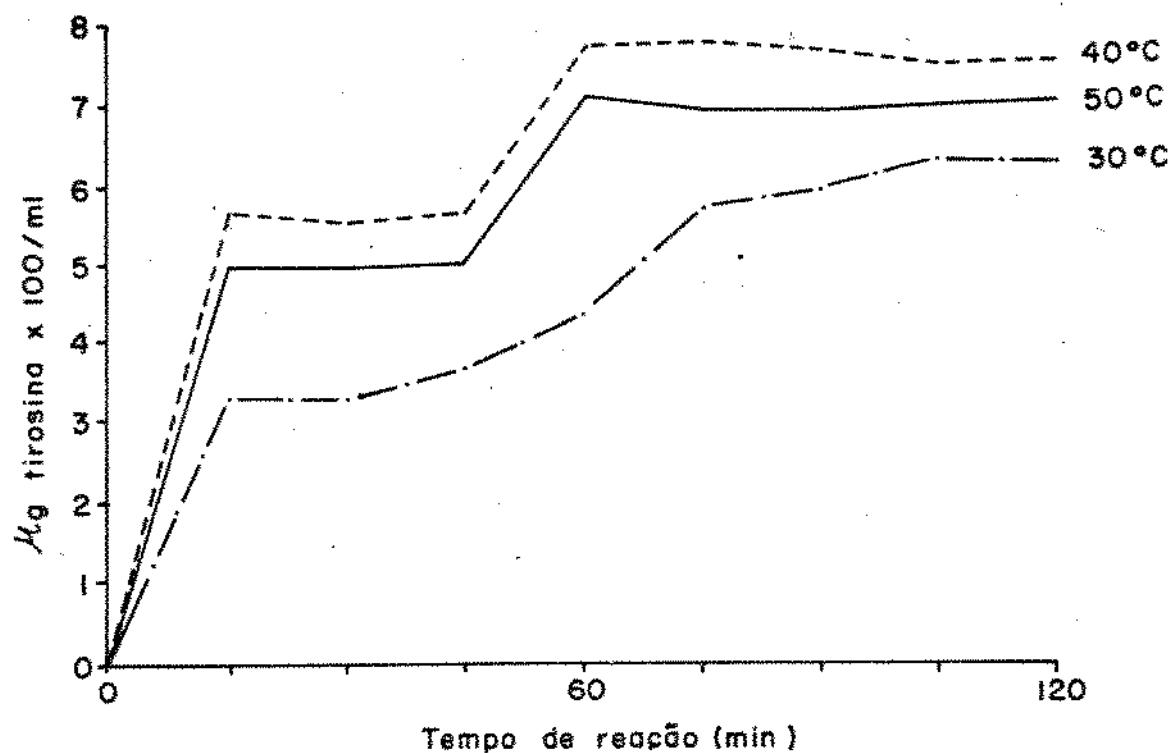


Condições de reação: pH 9

[S] = 1% prot. polpa, 2% após 45 min. de reação

[E] = 50% prot. extrato/prot. polpa

Fig. 24 - Efeito da temperatura na atividade enzimática do extrato do intestino da corvina  
Em cima: obtido com amostra de controle simples.  
Embaixo: obtido com amostra de controle reconstituída.

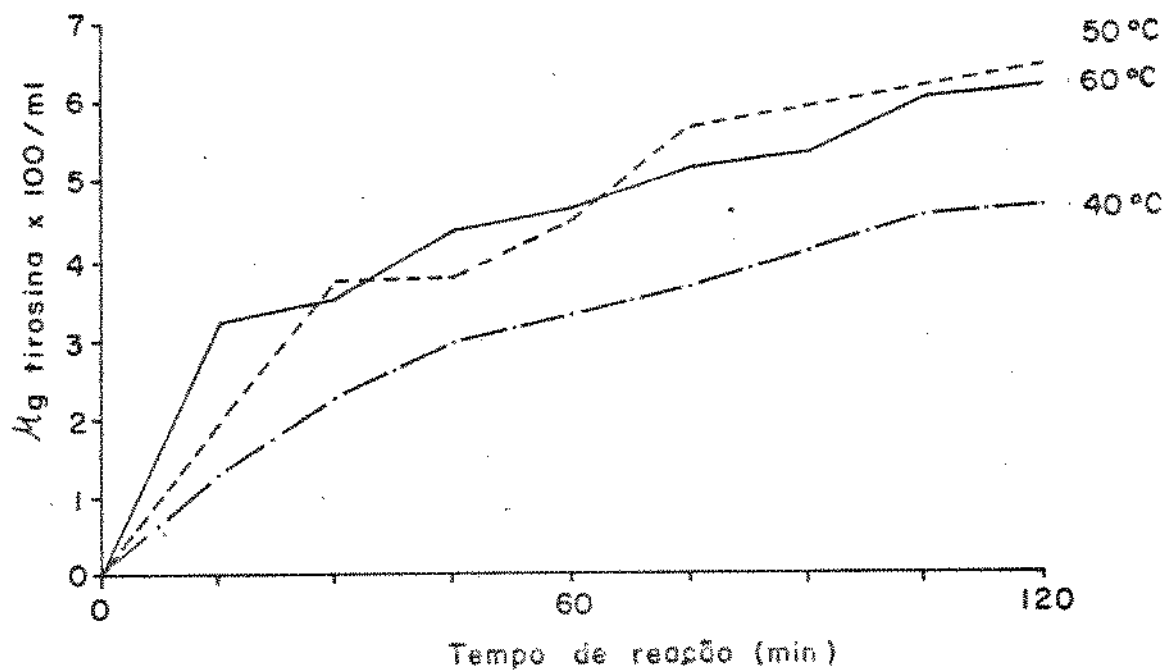


Condições de reação: pH 9

[S] = 1% proteína da polpa, 2% após 45 minutos de reação

[E] = 50% proteína do extrato/proteína da polpa

Fig. 25 - Efeito da temperatura na atividade enzimática do extrato de fígado da corvina



Condições de reação: pH 9

[S] = 1% proteína da polpa, 2% após 45 minutos de reação

[E] = 50% proteína do extrato/proteína da polpa

Fig. 26 - Efeito da temperatura na atividade enzimática do extrato do ceco pilórico da corvina

TABELA VI - Comparação entre a atividade proteolítica do extrato do intestino, fígado e ceco pilórico e a atividade da tripsina comercial

| TEMPO<br>(min) | SISTEMA ESTUDADO | ATIVIDADE<br>(% g T/ ml) | ATIVIDADE EM RELA-<br>ÇÃO A TRIPSINA CO-<br>MERCIAL |
|----------------|------------------|--------------------------|-----------------------------------------------------|
| 15             | Extrato bruto    | 24,180                   | 8%                                                  |
|                | Sobrenadante     | 52,286                   | 18%                                                 |
|                | Tripsina         | 299,059                  |                                                     |
| 30             | Extrato bruto    | 42,108                   | 11%                                                 |
|                | Sobrenadante     | 90,850                   | 24%                                                 |
|                | Tripsina         | 382,162                  |                                                     |
| 45             | Extrato bruto    | 60,591                   | 15%                                                 |
|                | Sobrenadante     | 117,198                  | 29%                                                 |
|                | Tripsina         | 403,841                  |                                                     |
|                | Extrato bruto    | 76,571                   | 17%                                                 |
|                | Sobrenadante     | 139,071                  | 30%                                                 |
|                | Tripsina         | 461,374                  |                                                     |

TABELA VII - Comparação entre a atividade proteolítica do extrato de vísceras da corvina e a soma das atividades dos órgãos componentes

| pH  | TEMPO | ATIVIDADE GLOBAL (G)<br>(U.E./g proteína) | SOMA DAS ATIVIDADES DOS ÓRGÃOS (C)<br>(U.E./g proteína) | G/C |
|-----|-------|-------------------------------------------|---------------------------------------------------------|-----|
| 3,0 | 8     | 8 571,814                                 | 3 799,586                                               | 2,3 |
|     | 15    | 5 543,130                                 | 2 639,810                                               | 2,1 |
| 7,0 | 8     | 10 717,809                                | 6 901,023                                               | 1,6 |
|     | 15    | 6 924,807                                 | 4 682,561                                               | 1,5 |
| 9,0 | 8     | 14 177,686                                | 9 456,550                                               | 1,5 |
|     | 15    | 9 482,424                                 | 6 109,444                                               | 1,6 |

TABELA VIII - Composição química da polpa e das vísceras da corvina

| PARTE DO PEIXE    | UNIDADE | PROTEÍNA | GORDURA |
|-------------------|---------|----------|---------|
| Estômago          | 81,66%  | 15,59%   | 0,90%   |
| Intestino         | 84,16%  | 11,45%   | 1,65%   |
| Fígado            | 79,77%  | 13,39%   | 4,05%   |
| Ceco pilórico     | 84,65%  | 11,80%   | 1,39%   |
| Conj. de vísceras | 82,51%  | 12,87%   | 1,80%   |
| Polpa             | 80,73%  | 17,46%   | 0,54%   |

## 6 - BIBLIOGRAFIA CITADA

- 1 - A.O.A.C. Official Methods of Analysis. Washington, William Horwitz Charman, 1960.
- 2 - BERGMAN, M. A Classification of proteolytic enzymes. In: NORD, F.F. & WERDMAN, comp. Advances in enzymology. New York, Interscience, 1942.
- 3 - CROSTON, C.B. Trypsin enzymes of chinook salmon. Arch. Biochem. Biophys. 89:202-6, 1961.
- 4 - CONN, E.E. & STUMPF, P.K. Outlines of biochemistry. 2.ed. New York, John Wiley & Sons, 1967.
- 5 - CUNNINGHAM, L. The structure and Mechanism of action of proteolytic enzymes. In: FLOORKIN & STOTZ, H., comp. Comprehensive biochemistry. New York, Elsevier, 1965. v.16, cap.3.
- 6 - DIXON, M. & WEBB, E.C. Enzymes. 2.ed. London, Longmans, 1967.
- 7 - EPPLER, A. The Endocrine Pancreas. In: HOAR, W.S. & RANDALL, D.J.. Fish Physiology. New York, Academic Press, 1969. v.2, cap. 5.
- 8 - HAMOIR, G. Fish Proteins. In: ANSON, M.L. et alii. Advances in Protein Chemistry. New York, Academic Press Inc, 1955. v.10.
- 9 - HAWK, P.B. et alii. Practical Physiological Chemistry. New York, Mc Graw Hill, 1954.
- 10 - HUANG, F.L. & TAPPEL, A.L. Action of Cathepsin C e D in protein hidrólisis. Biochemistry and Biophys. (236):739, 1971.
- 11 - IRWIN, W.S. Effects of temperature on enzymes kinetics. In: NORD, F.F. & WERDMAN, C.H. Advances in enzymology. New York, Interscience Publishers, 1943. v.3.
- 12 - JOHNSTON, W.W. Some characteristics of the enzymes of the pyloric caeca of cod and haddock. J. Biol. Board Can. 3:473-85, 1937.

- 13 - KARLSON, P. Bioguímica. Rio de Janeiro, Guanabara Koogan, 1970.
- 14 - KENYON, W.A. Digestive enzymes in poikilothermal vertebrates. Fisheries Bull, 41:181-200, 1925.
- 15 - KREVZER, R. Technology of fish utilization. In: FAO International Symposium, 1964.
- 16 - LÓPEZ, J.C. Enzimologia. Barcelona, Editorial Científico-Médica, 1969.
- 17 - LOWRY, O.H. et alii. Protein measurement with the folin phenol reagent. J. Biol. Chem. (193):265-75, 1951.
- 18 - MORITA, T. & ASSUNPÇÃO, R. Manual de soluções reagentes e solventes. São Paulo, Edgard Blucher, 1968.
- 19 - NEURATH, H. & BAILEY, K. The proteins, chemistry, biological activity and methods. New York, Academic Press, 1953. v.1.
- 20 - NICOL, J.A. The biology of marine animals. 2.ed. New York, John Wiley & Sons, 1967. cap. 6.
- 21 - NORTHROP, J.H. et alii. 1948. Cristalline Enzymes. 2.ed. New York, Columbia University, 1948.
- 22 - PHARMACIA FINE CHEMICALS. Sephadex gel-filtration in theory and practice. Uppsala, 1966.
- 23 - PHILIPS Jr., A.M. Nutrition, digestion and energy utilization. In: HOAR, W.S. & RANDALL, D.J. Fish physiology. New York, Academic Press, 1969. v.1. cap.7.
- 24 - ROMER, A.S. Anatomia Comparada (vertebrados) 3.ed. México Interamericana, 1962. cap. 12.
- 25 - SCHULTZ, H.W. Food enzymes. London, AVI Publishing, 1960.
- 26 - SIEBERT, G. & SCHMITT. Fish tissue enzymes and their role in the deteriorative changes in fish. [s.l.] 1964.
- 27 - SLIWINSKI, R. A. et alii. A Study of the proteolytic enzymes in beef muscle. J. Agr. Food Chem., 7:778-91, 1959.
- 28 - SMITH, E.L. Proteolytic enzymes. In: SUMNER, B & MYRBACH, K., comp. The Enzymes. New York, Academic Press [s.d.] v.1.
- 29 - STANSBY, M.E. & OSCOLT, H.S. Composición del pescado. In: STANSBY, M.E. Tecnología de la Industria Pesquera. Zaragoza, Acribia, 1957. cap. 26.

- 30 - SUDEPE - PAO - PEP. Avaliação da indústria pesqueira do Rio Grande do Sul - capacidade, produção e comercialização. Série Documentos Ocasionais, Rio Grande, n. 15, 1976.
- 31 - \_\_\_\_\_. Desembarque de Pescaço no Rio Grande do Sul. Rio Grande, 1976.
- 32 - \_\_\_\_\_. Desembarque de Pescaço no Rio Grande do Sul. Rio Grande, 1977.
- 33 - TANJII, S. Estudo do conteúdo estomacal da pescada foguete. (Macrodon ancylodon) e da corvina (micropogon furnieri). Boletim do Instituto de Pesca. Santos, Secretaria de Estudos dos Negócios da Agricultura, v.3, n.2, 1974. p.21-36.
- 34 - TAUBER, H. The chemistry and technology of enzymes. New York, John Willey & Sons, 1956.
- 35 - TOGASAWA, Y et alii. Preparation of cristalline proteinase of bonito pyloric caeca. Japan Soc. Sci Fisheries. 25:470-72, 1959.
- 36 - WALSH, F.A. Trypsinogens and Trypsins of various species. In: GERTRUDE & PERLMAN, comp. Methods in Enzimology. [s.l.] 1970.
- 37 - WHITE, A et alii. Principles of biochemistry. 3.ed. New York, Mc. GRAW HILL, 1964. cap.12.
- 38 - WILCOX, P.E. Chimotrypsinogens and chimotripsins. In: GERTRUDE & PERLMAN, comp. Methods in enzimology. [s.l.] 1970. v.19.