

ENSAIO PRELIMINAR AO ESTUDO DAS PROTEASES EM HEMOLINFA DE JOVENS DA LAGOSTA *PANULIRUS LAEVICAUDA* (LATREILLE)

Gustavo Hitzschky Fernandes Vieira⁽¹⁾

Luiz Carlos da Silva⁽²⁾

Silvana Saker-Sampaio

Alexandre Holanda Sampaio

Laboratório de Ciências do Mar
Universidade Federal do Ceará
Fortaleza – Ceará – Brasil

As lagostas do gênero *Panulirus* White constituem um dos principais recursos pesqueiros do Nordeste do Brasil, sendo o Ceará o seu maior produtor.

Apesar da grande importância deste crustáceo para a economia nordestina, poucos são os estudos sobre o mesmo referente a sua fisiologia e bioquímica. Praticamente, todo o conhecimento científico a esse respeito é oriundo de outros países cujas condições ambientais são bastante distintas das que predominam na região nordestina.

Nos crustáceos o sistema circulatório é aberto e o sangue-hemolinfa tem as funções básicas do transporte de oxigênio, força tamponante, atividade osmótica, transporte de material nutritivo e de metabólitos de baixo peso molecular (Maynard, 1960; Johnston & Davies, 1971), bem como armazenador de glicogênio de importância fundamental para a construção do novo exoesqueleto no ciclo de muda (Trujillo, 1982).

A hemolinfa é um tecido cujas características variam com o estado fisiológico

do animal e responde prontamente às modificações do meio ambiente. O fenômeno da muda é um dos fatores que provoca as mais profundas transformações nos crustáceos, influenciando diretamente no metabolismo hídrico, protéico e glicídico.

O ciclo de crescimento dos crustáceos não é somente acompanhado por modificações periódicas no exoesqueleto, epiderme e hepatopâncreas, mas também por marcadas alterações no sangue e urina (Travis, 1955). Em consequência, pode-se admitir que as proteínas estruturais e enzimáticas devem variar profundamente com o estágio de muda.

O presente trabalho aborda, em caráter preliminar, a investigação da presença de proteases em hemolinfa de jovens da lagosta *Panulirus laevicauda* (Latreille), suas principais características, bem como sua relação com o ciclo de muda nos diferentes estágios.

MATERIAL E MÉTODOS

Indivíduos jovens da lagosta *Panulirus laevicauda* foram coletados nas praias do Meireles e Titanzinho (Fortaleza - Ceará - Brasil), estocadas nos aquários do Laboratório de Ciências do Mar, e retirados quando necessários para a obtenção da hemolinfa.

(1) Professor Adjunto do Departamento de Engenharia de Pesca da Universidade Federal do Ceará e Pesquisador do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).

(2) Engenheiro de Pesca, graduado pela Universidade Federal do Ceará.

A determinação dos estágios do ciclo de muda foi feita pelo método de Drach (1939), citado por Travis (1955) e Aiken (1980): *estágio A* — aquele que se segue imediatamente à muda, onde a nova carapaça é de consistência de uma membrana macia; *estágio B* — inicia o endurecimento preliminar da carapaça; *estágio C* — a carapaça fica inteiramente dura, sendo este de intensa atividade alimentar, e o de mais longa duração; e *estágio D* — aquele em que a nova carapaça é progressivamente formada sob a velha, e o animal não se alimenta.

Os ensaios para determinação e caracterização do sistema enzimático foram feitos com o extrato de hemolinfa, no estágio C do ciclo de muda.

A hemolinfa foi retirada de animais vivos, através de um corte com tesoura na junção do abdômen com o cefalotórax, deixando-a escorrer por um funil até um becker, mantido em banho de gelo para manter a temperatura em torno de 0°C. O material foi centrifugado imediatamente a 3000 rpm em centrífuga refrigerada, modelo PR-J International Equipment Company, por 10 minutos a 4°C. O sobrenadante foi diluído em tampão fosfato 0,01 M em NaCl 0,1 M, pH 7,0, na proporção 1:10 (v/v), e estocado em congelador para posterior utilização.

Nos extratos foram determinadas as concentrações de proteína e a atividade proteolítica.

A concentração de proteína foi determinada pelo método do Micro-biureto (Goa, 1953), usando-se como padrão a albumina sérica bovina (Sigma), sendo os resultados expressos em mg de proteína por ml.

A atividade proteolítica, capacidade de hidrolisar a caseína, foi determinada pela reação de 0,25 ml do extrato, 5,0 ml de caseína (segundo Hammarsten, E. Merk AG Darmstadt) a 1% em tampão fosfato 0,01 M e cloreto de sódio 0,1 M pH 7,0. O tempo de reação foi de 45 minutos a 50°C. Parou-se a reação com 1,0

ml de ácido tricloroacético (TCA) a 40% (Ainouz *et al.*, 1972). Após 15 minutos de repouso, a mistura foi filtrada em papel filtro quantitativo Framex, faixa branca, sendo a atividade proteolítica determinada na fração solúvel em TCA e medida pela absorbância em 750 nm em espectrofotômetro Varian Techtron modelo 635 K, depois da reação com o reagente de Folin (Lowry *et al.*, 1951). O tempo zero ou branco da reação foi obtido pela adição do substrato após ter sido adicionado TCA a 40%.

Todos os valores de densidade ótica das amostras foram subtraídos dos valores dos brancos. A uma unidade de atividade correspondeu a variação de 0,1 de densidade ótica. A atividade proteolítica foi expressa em unidade de atividade (U. A.) por ml e a atividade específica, determinada através da divisão da atividade proteolítica pela concentração de proteína, sendo os resultados expressos em U.A./mg de proteína.

O pH ótimo foi determinado usando-se a mistura de reação nos pHs 6,0; 6,5; 7,0; 7,5; 8,0; 9,0 e 10,0.

O tempo e a temperatura ótimos foram determinados mediante a incubação da enzima e substrato em temperatura de 40, 45 e 50°C, durante períodos de 15, 30, 45, 60 e 90 minutos.

A relação enzima/substrato foi determinada variando-se a caseína de 10 a 96 mg, conservando-se o volume final de 10 ml.

Os resultados da atividade enzimática relativa aos experimentos citados foram expressos em unidade de atividade por ml (U.A./ml).

A termo-estabilidade foi determinada submetendo-se previamente o extrato às temperaturas de 40°C e 60°C durante um período de tempo que variou de 0 a 60 minutos. Os resultados, em U.A./ml, foram transformados em porcentagens de atividade, sendo considerada 100% a atividade do extrato não submetido ao calor.

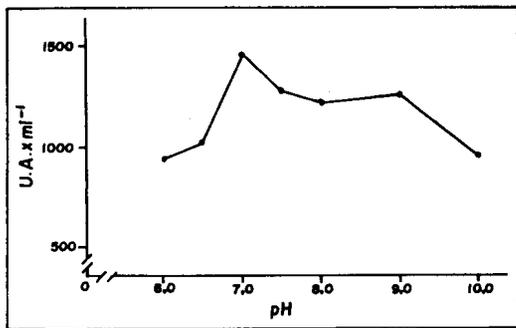


Figura 1 — Variação da atividade proteolítica de hemolinfa de jovens da lagosta *Panulirus laevicauda* (Latreille), em função do pH.

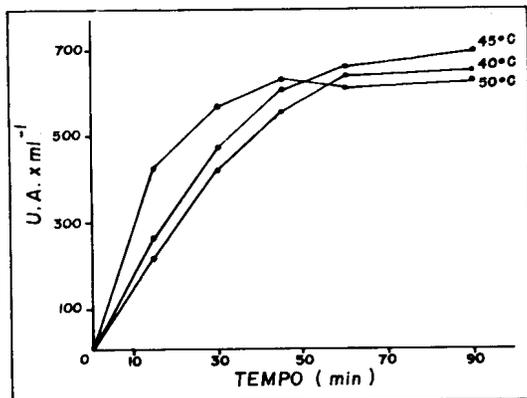


Figura 2 — Variação da atividade proteolítica de hemolinfa de jovens da lagosta *Panulirus laevicauda* (Latreille), em função do tempo e temperatura de incubação.

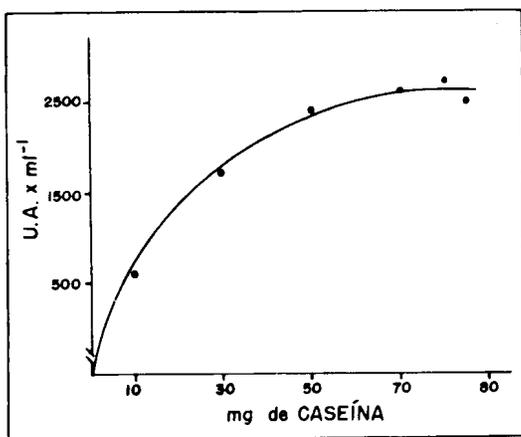


Figura 3 — Variação da atividade proteolítica de hemolinfa de jovens da lagosta *Panulirus laevicauda* (Latreille), em função da concentração do substrato.

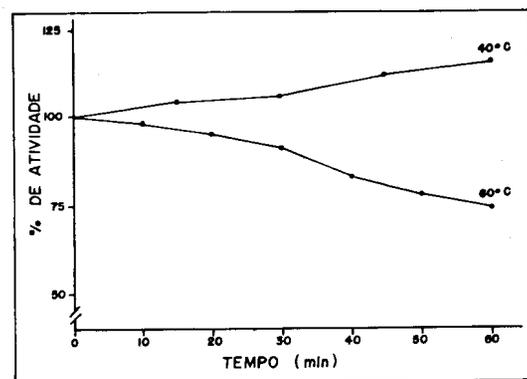


Figura 4 — Variação percentual da atividade proteolítica na hemolinfa de jovens da lagosta *Panulirus laevicauda* (Latreille), em função do tempo e temperatura de aquecimento do extrato.

O extrato de hemolinfa, preparado com tampão fosfato 0,01 M em NaCl 0,1 M, pH 7,0 na proporção de 1: 10 (v/v), foi usado para o fracionamento com sulfato de amônia. Este foi sendo adicionado gradativamente ao extrato para atingir uma saturação de 20% e, após 15 minutos (25°C), o precipitado foi removido por centrifugação (20.000 x g, 15 minutos, 4°C). O sobrenadante foi utilizado para as próximas precipitações a 40, 60, 80 e 100% de saturação. Os precipitados obtidos foram suspensos em tampão fosfato 0,01 M em NaCl 0,1 M, pH 7,0 e dialisados contra água destilada (4°C), até que a reação da água com o hidróxido de bário fosse negativa. O conteúdo de proteína e as atividades pro-

teolíticas foram determinadas em todas as frações, sendo estes expressos em U.A./mg proteína.

Determinou-se a atividade proteolítica e a concentração de proteína nos estágios B, C e D do ciclo de muda.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A atividade proteolítica apresentou um pico máximo em pH 7,0 e outro de menor intensidade em pH 9,0. Estes dois picos de atividade sugerem a presença de duas proteases que hidrolisam a caseína, sendo que o pH 7,0 corresponde a 87,6% de toda a atividade proteolítica do extrato total (figura 1).

Vários autores reportam a atividade proteolítica máxima em pHs que variam de 6,0 a 8,4 (Gates & Travis, 1969; De Villez, 1975; Trellu & Ceccaldi, 1976). Recentemente, Saker *et al.*, (1982) encontraram enzimas proteolíticas com máximo de atividade nos pHs 7,0 e 9,0 em hepatopâncreas de jovens da lagosta *Panulirus laeviscauda*. A presença de proteases na hemolinfa é bastante justificável, devido ao papel fundamental que ela exerce, ou seja, na condução de substâncias nutritivas para o corpo do animal, possibilitando o seu crescimento e desenvolvimento, contestando aquilo relatado por Damboviceanu (1929), que as proteases estariam ausentes na hemolinfa de crustáceos.

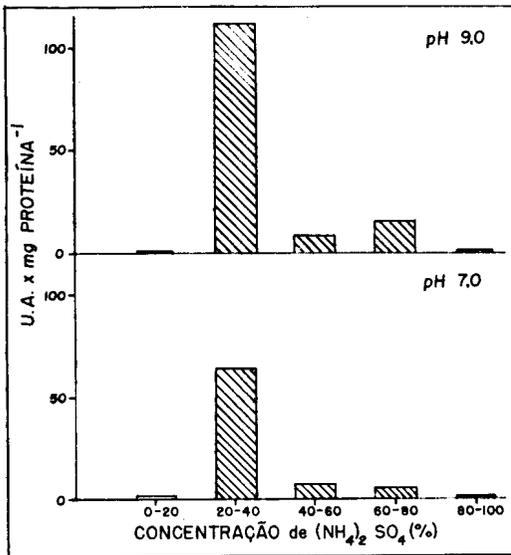


Figura 5 – Atividade específica da enzima de hemolinfa de jovens da lagosta *Panulirus laeviscauda* (Latreille), em relação à sua saturação com sulfato de amônia.

A figura 2 mostra que a atividade proteolítica aumenta com o acréscimo da temperatura de incubação. Esta atividade apresentou um incremento percentual mais elevado, à temperatura de 50°C com o tempo de 45 minutos, razão pela qual esta temperatura foi escolhida para os ensaios enzimáticos.

A temperatura ótima de 50°C para proteases, quando se utiliza a caseína como substrato, condiz com a literatura (Stern & Lockhart, 1953, Croston, 1969; Dobrowski & Glogowski, 1977; Saker *et al.*, 1982).

A saturação da enzima frente ao substrato ocorreu em 0,25 ml do extrato para 80 mg de caseína (figura 3). Estes valores indicam uma atividade superior àquelas encontradas por Prisco & Vieira (1976) e Ainouz *et al.*, (1981) em outros materiais biológicos, porém inferior

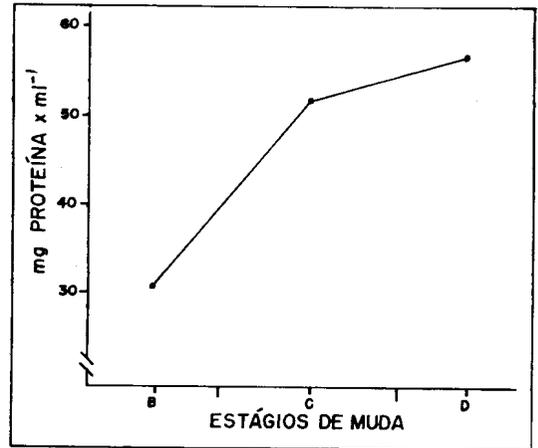


Figura 6 – Variação do conteúdo de proteína solúvel em hemolinfa de jovens da lagosta *Panulirus laeviscauda* (Latreille), em função dos estágios do ciclo de muda.

TABELA I

Dados relativos a purificação com sulfato de amônia, de proteases da hemolinfa de jovens da lagosta *Panulirus laeviscauda* (Latreille).

% de Sulfato de amônia	pH 7,0					pH 9,0				
	U.A./ml	mg P/ml	U.A./mg P	Recuperação (%)	Vezes de purificação	U.A./ml	mg P/ml	U.A./mg P	Recuperação (%)	Vezes de purificação
0	1.440	37,7	38,2	100,0	1,0	1.500	37,7	39,8	100,0	1,0
0 - 20	0	0	—	—	—	0	0	—	—	—
20 - 40	122	1,9	64,6	5,0	1,7	210	1,9	111,1	5,0	2,8
40 - 60	160	23,2	6,9	61,4	0,2	198	23,2	8,6	61,4	0,2
60 - 80	8	1,4	5,8	3,6	0,2	22	1,4	16,1	3,6	0,4
80 - 100	0	0	—	—	—	0	0	—	—	—

àquela descrita por Saker *et al.*, (1982) em hepatopâncreas de jovens da lagosta *Panulirus laevicauda*.

O sistema enzimático apresentou-se bastante estável em relação às temperaturas a que foi submetido. A 40°C houve ativação das proteases, entretanto a 60°C, observou-se uma relação crescente da atividade proteolítica em relação ao tempo de exposição do extrato ao calor, atingindo uma perda de 25% ao final de 60 minutos (figura 4).

A purificação do sistema enzimático apresentou uma atividade máxima, para o pH 7,0, na fração 20-40% de saturação com sulfato de amônia, seguindo-se das

frações 40-60% e 60-80%. No pH 9,0, o máximo de atividade ocorreu também na fração 20-40% (tabela I; figura 5).

Mantel *et al.* (1975) e Hepper (1977) citam que a concentração de proteína na hemolinfa de crustáceos, depende do estágio de muda. Na figura 6, observa-se que o nível de proteína foi mais elevado no estágio D, estando de acordo com os valores encontrados por Travis (1955) para a lagosta *Panulirus argus* (Latreille), e Saker *et al.* (1982) e Sampaio *et al.* (1984) encontraram valores máximos de proteína no hepatopâncreas também no estágio D, para *Panulirus laevicauda*.

A atividade proteolítica específica atingiu um valor máximo no estágio D do ciclo de muda (tabela 2; figura 7). Isto poderia ser entendido como um mecanismo fisiológico da lagosta para prover as várias regiões do corpo com material necessário para a consolidação da nova carapaça. No hepatopâncreas a atividade proteolítica é maior no estágio C (Saker *et al.*, 1982), quando o indivíduo armazena substâncias nutritivas para suprir o período de jejum alimentar que ocorre no estágio D, ocasionando uma diminuição na atividade proteolítica no hepatopâncreas, fato também citado por Trelu & Ceccaldi (1976). Estas observações sugerem que há uma transferência de compostos nitrogenados do hepatopâncreas para a hemolinfa, no estágio D, quando então haveria um aumento das enzimas proteolíticas com a finalidade de hidrolisi-

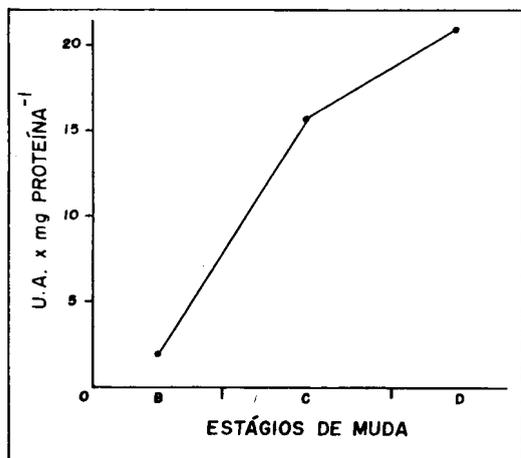


Figura 7 — Variação da atividade proteolítica de hemolinfa de jovens da lagosta *Panulirus laevicauda* (Latreille), em relação aos estágios de muda.

TABELA II

Variação da atividade proteolítica em hemolinfa de jovens da lagosta *Panulirus laevicauda* (Latreille), em relação aos estágios do ciclo de muda.

Estágios do ciclo de muda	U.A./ml			mg Proteína/gnl			U.A./mg de Proteína		
	Mi	Ma	M̄	Mi	Ma	M̄	Mi	Ma	M̄
B	10,0	120,0	52,5	23,3	36,0	31,6	0,3	5,2	1,9
C	40,0	1570,0	350,7	7,6	115,0	51,9	1,6	101,7	15,5
D	70,0	1580,0	948,0	19,9	82,3	57,4	0,9	44,8	21,4

Convenção: Mi — valor mínimo; Ma — valor máximo; M̄ — valor médio.

sar as proteínas oriundas do hepatopâncreas, facilitando o transporte destes compostos a regiões de crescimento, necessitadas de material nutritivo.

CONCLUSÕES

- 1 — Os valores máximos de atividade enzimática ocorreram nos pHs 7,0 e 9,0.
- 2 — A temperatura ótima de reação foi a 50°C, com uma incubação de 45 minutos.
- 3 — A relação enzima-substrato foi de 80 mg de substrato (caseína) para 0,25 ml do extrato de hemolinfa.
- 4 — O sistema enzimático foi estável à temperatura de 40°C, perdendo 25% de sua atividade quando submetido a 60°C por 60 minutos.
- 5 — O máximo de atividade específica foi obtido na fração 20-40% do precipitado com sulfato de amônia, correspondendo à purificação de 1,7 e 2,8 vezes em relação ao extrato bruto, nos pHs 7,0 e 9,0, respectivamente.
- 6 — A concentração máxima de proteína na hemolinfa foi obtida no estágio *D* e seu mínimo, no estágio *B*.
- 7 — A atividade específica da enzima, quanto aos estágios de muda, teve seu valor máximo no estágio *D*.

SUMMARY

English title: Preliminary study of the action of proteases on hemolymph of juveniles of lobster *Panulirus laevicauda* (Latreille).

This paper is a preliminary study of the action of proteases on hemolymph in lobster *Panulirus laevicauda*, collected at Fortaleza (Ceará State, Brazil), and its relation to the molting stages as determined through the method of Drach (1939).

The main conclusions drawn from the experiments are:

1 — The highest values of enzymatic activity occurred at pHs 7.0 and 9.0.

2 — The optimum reaction temperature was at 50°C, at an incubation time of 45 minutes.

3 — The relationship enzyme-substrate worked at 80 mg of substrate to 0,25 ml of hemolymph extract.

4 — The enzymatic system remained stable at a temperature of 40°C, losing 25% of its activity when submitted to a 60°C temperature for 60 minutes.

5 — The maximum level of specific activity was reached at a fraction 20-40% of the precipitate with ammonia sulphate, regarding a purification from 1.7 to 2.8 times in relation to the raw extract, at pHs 7.0 and 9.0, respectively.

6 — The maximum concentration of protein in the hemolymph was obtained at stage *D*, and its minimum at stage *B*.

7 — The specific activity of the enzyme, as to the molting stages, showed its highest value at stage *D*.

BIBLIOGRAFIA

Aiken, D.E. — 1980 — Molting and growth, pp. 91-163, in J. S. Cobb & B. F. Phillips (eds), *The biology and management of lobsters*, Vol. 1. Academic Press Inc., 463 pp., New York.

Ainouz, I. L.; J. Xavier-Filho & E. Gomes-Filho — 1972 — Atividade proteolítica em sementes de *Vigna sinensis* cv seridó. *Ciência e Cultura*, São Paulo, 204: 104.

Ainouz, I. L.; N. B. Benevides & A. L. P. Freitas — 1981 — Proteolytic activities in seeds of *Vigna unguiculata* (L.) Walp. *Biol. Plant.*, Praga, 23 (2): 133-140.

Croston, C. B. — 1960 — Tryptic enzymes of chinook salmon. *Arch. Biochem. Biophys.*, New York, 89: 202-206.

Dabrowski, K. & J. Glogowski — 1977 — Studies on the role of exogenous proteolytic enzymes in digestion process in fish. *Hydrobiologia*, 54 (2): 129-134.

Damboviceanu, A. - 1929 - Recherches sur les constantes physicochimiques du plasma des Invertébrés à l'état normal et en cours d'immunization. I. Constantes du plasma de quelques

crustacés Décapodes à l'état normal. *Arch. Roumaines Pathol. Exptl. Microbiol.*, 2: 5-38.

De Villez, E. J. — 1975 — Observations on the proteolytic enzymes in the digestive fluid of the barnacle *Balanus nubilus*. *Comp. Biochem. Physiol.*, London, 51: 471-474.

Drach, P. — 1939 — Mue et cycle d'intermue des les crustacés décapodes. *Ann. Inst. Oceanogr.* 19: 103-391.

Gates, B. J. & J. Travis — 1969 — Isolation and comparative properties of shrimp trypsin. *Biochemistry*, 8 (11): 4483-4489.

Goa, J. — 1953 — A micro biuret method for protein determination. Determination of total protein in cerebrospinal fluid. *Scand. J. Clin. Lab. Invest.*, 5: 218-222.

Hepper, B. T. — 1977 — Changes in blood serum protein levels during the moulting cycle of the lobster, *Homarus gammarus*. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.*, Amsterdam, 28: 293-296.

Johnston, M. A. & P. S. Davies — 1971 — Possible hepatic function for crustacean blood cells. *Nature*, London, 230: 471-472.

Lowry, O. H.; N. J. Rosebrough; A. L. Farr & R. J. Randall — 1951 — Protein measurement with the folin phenol reagent. *Journ. Biol. Chem.*, Baltimore, 193: 265-275.

Maynard, D. M. — 1960 — Circulation and heart function, pp. 161-214, in T. H. Waterman (ed.), *The physiology of crustacea*, Vol. 1. Academic Press, XVII + 670 pp., New York.

Mantel, L. H.; D. E. Bliss; S. W. Sheehan & E. A. Martinez — 1975 — Physiology of hemolymph, gut fluid and hepatopancreas of the land crab *Gecarcinus lateralis* (F.), in various neuroendocrine states. *Comp. Biochem. Physiol.*, London, 51: 663-671.

Prisco, J. T. & G. H. F. Vieira — 1976 — Effects of NaCl salinity on nitrogenous compounds and proteases during germination of *Vigna sinensis* seeds. *Physiol. Plant.*, Stockholm, 36: 317-320.

Saker, S. A.; G. H. F. Vieira & A. H. Sampaio — 1982 — Ensaio preliminar ao estudo de caracterização e propriedades de enzimas proteolítica em hepatopâncreas de jovens da lagosta *Panulirus laevicauda* (Latreille). *Arq. Ciên. Mar*, Fortaleza, 22 (1/2): 57-66.

Sampaio, A. H.; G. H. F. Vieira & S. A. Saker — 1984 — Estudo preliminar sobre o sistema RNA-RNase em hepatopâncreas de jovens da lagosta *Panulirus laevicauda* (Latreille). *Arq. Ciên. Mar*, Fortaleza, 23: 43-49.

Stern, J. A. & E. E. Lockhart — 1953 — A study of the proteolytic enzyme activity of the pyloric caeca of redfish. *J. Fish. Res. Board Can.*, Ottawa, 10 (1): 590-598.

Travis, D. F. — 1955 — The molting cycle of the spiny lobster *Panulirus argus* (Latreille). III- Physiological changes which occur in the blood and urine during the normal molting cycle. *Biol. Bull.*, 109: 484-503.

Trellu, J. & H. Ceccaldi — 1976 — Variations des activités enzymatiques de l'hépatopancréas et du muscle de *Palaemon serratus* (Crustacé Décapode) au cours du cycle d'intermus. *Soc. Biol. Marseille*, 171: 115-121.

Trujillo, L. R. — 1982 — Variaciones del metabolismo glucídico en el cangrejo moro *Menippe mercenaria* (Say, 1818) en condiciones experimentales. *Rev. Invest. Mar.*, Havana, 3 (3): 97-115.