

KALEEN MASSARI LEITE

**Inibidor de Tripsina e Atividade Antibacteriana do Peixe
Tilápia do Nilo
(*Oreochromis niloticus*)**



Recife, 2011

Universidade Federal de Pernambuco
Programa de Pós-Graduação em Bioquímica e Fisiologia

KALEEN MASSARI LEITE

Inibidor de Tripsina e Atividade Antibacteriana do Peixe
Tilápia do Nilo
(*Oreochromis niloticus*)

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Bioquímica e Fisiologia da Universidade Federal de Pernambuco, como cumprimento parcial das exigências para obtenção do título de Mestre.

Orientadora: Profa. Luana Cassandra Breitenbach Barroso Coelho, M.C., Ph.D

Co-Orientadora: Profa. Patrícia Maria Guedes Paiva, M.C., Dr.

Recife, 2011

Leite, Kaleen Massari

Inibidor de tripsina e atividade antibacteriana do peixe Tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) / Kaleen Massari Leite. – Recife: O Autor, 2011.

33 folhas, il., fig., tab.

Orientador: Luana Cassandra Breitenbach Barroso Coelho

Co-orientador: Patrícia Maria Guedes Paiva

Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Pernambuco.

Centro de Ciências Biológicas. Bioquímica e Fisiologia, 2011.

Inclui bibliografia.

1. Tilápia (peixe) 2. Proteases 3. Aproveitamento de resíduos I. Título.

597.74

CDD (22.ed.)

UFPE/CCB-2011-157

Kaleen Massari Leite

"Inibidor de tripsina e atividades antibacterianas de fígado do peixe tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*)"

Dissertação apresentada para o
cumprimento parcial das exigências
para obtenção do título de Mestre em
Bioquímica e Fisiologia pela
Universidade Federal de Pernambuco

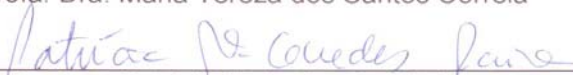
Aprovado por:



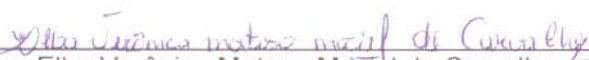
Profa. Dra. Luana Cassandra Breitenbach Barroso Coelho
Presidente



Profa. Dra. Maria Tereza dos Santos Correia



Profa. Dra. Patricia Maria Guedes Paiva



Dra. Elba Verônica Matoso Maciel de Carvalho

Data: 21 / 02 / 2011

SUMÁRIO

Dedicatória	I
Agradecimentos	II
LISTA DE FIGURAS	III
LISTA DE TABELAS	IV
RESUMO	V
Abstract	VI
1 INTRODUÇÃO	01
1.1 Proteases	01
1.1.1 <i>Serinoproteases</i>	01
1.1.2 <i>Proteases em Peixes</i>	03
1.2 Inibidores de Proteases	03
1.2.1 <i>Inibidores de Serinoproteases</i>	04
1.2.2 <i>Importância e Aplicação dos Inibidores</i>	06
1.2.2.1 <i>Inibidores de Proteases e Atividade Antibacteriana</i>	06
1.2.3 <i>Inibidores em Peixes</i>	06
1.3 Tilápia (<i>Oreochromis niloticus</i>)	07
1.3.1 <i>Aproveitamento de resíduos da filetagem de tilápia</i>	08
2 JUSTIFICATIVA	10
3 REFERÊNCIAS	11
4 OBJETIVOS	16
4.1 Objetivo Geral	16
4.2 Objetivos Específicos	16
5 CAPÍTULO I	17
Abstract	18
5.1 Introduction	19
5.2 Material and methods	20
5.2.1 <i>Fish material</i>	20
5.2.2 <i>O. niloticus viscera preparations</i>	20
5.2.3 <i>Protein content</i>	21
5.2.4 <i>Trypsin inhibitor activity</i>	21
5.2.5 <i>Chromatography on Trypsin-Agarose column</i>	22

5.2.6 <i>Polyacrylamide gel electrophoresis</i>	22
5.2.7 <i>Antibacterial activity</i>	22
5.3 Results and discussion	23
5.4 Conclusion	28
Acknowledgments	28
References	29
6 CONCLUSÕES	33

Dedico este trabalho á minha Vó Dulce (*in memorian*), que é meu anjo da guarda, ao meu pai Enelce (*in memorian*), pelo pai amoroso que sempre foi, à minha mãe e minha irmã, pelo amor imensurável, ao meu cunhado pela torcida, ao meu sobrinho de coração Diego, por ser a luz da minha casa, aos meus companheiros Emmanuel e Thiago e minha amiga Rosy, que me ajudaram muito na realização desse trabalho.

Agradecimentos

Primeiramente agradeço a Deus e aos irmãzinhos de luz que são responsáveis por me guiar, iluminar e cuidar de todos os caminhos da minha vida.

Agradeço ao meu pai, Enelce (*in memorian*) e minha mãe, Sônia, que são os grandes responsáveis pela minha existência e por quem eu sou hoje.

À minha amada Vovó Dulce (*in memorian*) por tudo que sempre fez por mim e que também é a grande responsável pela minha formação.

À minha irmã, Kathleen pela amizade, carinho, admiração e confiança na minha atuação profissional e ao meu cunhado, João Paulo, pelo apoio dado.

Ao meu sobrinho, Diego pelos sorrisos e carinhos amorosos que tanto me ajudaram nos momentos de mais dificuldade.

À todos os meus amigos que não posso citar nomes, pois eu acabaria sendo injusta se faltasse algum.

Agradecimentos muito especiais à amiga Elba pela oportunidade, incentivo, amizade e carinho dedicados a mim. Esse mestrado devo a ela também.

Aos companheiros Emmanuel, Thiago e minha amiga Rosy que me ajudaram intensamente na realização deste trabalho, sem eles o resultado não seria o mesmo.

À querida professora Patrícia Paiva meu imenso agradecimento pela compreensão, dedicação e carinho oferecidos a mim.

À Professora Luana, por ter sido minha orientadora me dando a oportunidade de crescimento profissional e pessoal.

A todos aqueles que fazem o Laboratório de Glicoproteínas e que acompanharam passo a passo deste trabalho.

A todos os técnicos e funcionários do Departamento de Bioquímica da UFPE, em especial Sr João e Maria pela ajuda nos momentos em que mais precisei.

Agradeço a todos que sempre torceram por mim.

Sempre agradecerei por tudo!

LISTA DE FIGURAS

INTRODUÇÃO

Figura 1	Estrutura tridimensional da tripsina, enzima da família das serinoproteases I.	02
Figura 2	Mecanismo de inibição de serinoproteases	05
Figura 3	Tilápia do Nilo (<i>Oreochromis niloticus</i>)	07
Figura 4	Resíduos de Processamento de Pescado	08

CAPÍTULO I / Artigo

Figure. 1	(A) Chromatography of LF20-40 on Trypsin-Agarose column; fractions (1.0 mL) were collected; Insets 1 and 2 show SDS-PAGE of unadsorbed (fractions 3 to 15) and adsorbed (fractions 30-34) pools, respectively. Polypeptides were stained with Coomassie Brilliant Blue. (B) Trypsin inhibitor activity and protein concentration of unadsorbed and adsorbed pools.	26
------------------	--	----

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO I

Table 1	Characterization of fractions from liver, stomach and intestine of tilapia	24
Table 2	Antibacterial activity from LF20-40.	27

RESUMO

Tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) é um dos peixes mais populares de criação no mundo, tem excelente adaptação e reprodução em ambientes lênticos e possui filé de alta qualidade. Além das peças limpas e comestíveis do pescado, há uma quantidade substancial de resíduos de peixe. Muitas vezes, esse remanescente de resíduos é despejado em rios, causando um desequilíbrio ambiental. Carcaças e vísceras de tilápia têm um alto valor protéico a ser usado na produção de alimentos para organismos aquáticos. A utilização de resíduos de pescado diminui o risco de poluição ambiental e gera receitas econômicas. Estudos mostraram que os resíduos podem ser usados na recuperação de compostos úteis, incluindo proteínas que têm atividade antimicrobiana. O presente trabalho relata a presença de inibidor de tripsina de tilápia no fígado, estômago e intestino, bem como a purificação do inibidor de tripsina *O. niloticus* (OnTI) e atividade antibacteriana do fígado, víscera de maior atividade inibidora de tripsina específica. As vísceras foram separadas e homogeneizadas com 0,15 M NaCl e os homogeneizados foram tratados com sulfato de amônio. Concentrações de proteínas das frações dos precipitados e sobrenadantes foram dosadas, aquecida a 80 ° C por 1 h, e avaliadas quanto à atividade do inibidor de tripsina. O precipitado da fração 20-40% de fígado (LF20-40) de alta atividade inibidora de tripsina específica foi utilizado para purificação do inibidor e em testes de atividade antibacteriana; sendo determinadas as concentrações inibitórias mínima (CIM) e bactericidas (CBM). Frações de sulfato de amônio de fígado e estômago apresentaram atividade do inibidor de tripsina superior às frações de intestino. *O. niloticus* inibidor de tripsina (OnTI) ligado à coluna Tripsina-Agarose foi eluído com 0,5 M KCl-HCl pH 2,0. OnTI apresentou atividade específica de 950 U / mg e duas bandas de proteínas em SDS-PAGE. A atividade antibacteriana sobre *S. aureus* foi detectada pela LF20-40 (MIC: 0,09 mg / mL; MBC: 0,76 mg / mL), a fração também foi capaz de inibir o crescimento de *K. pneumoniae* (MIC: 1,53 mg / mL), mas não apresentou atividade antibacteriana contra *E. coli*. Os resultados revelaram que o fígado e estômago de tilápia contem inibidor de tripsina. O efeito da preparação do fígado de tilápia sobre *S. aureus* e *K. pneumoniae*, indica que esta víscera, normalmente descartada como resíduo, é uma fonte potencial de agentes antibacterianos.

Palavras-chave: *Oreochromis niloticus*, inibidor de tripsina; resíduos de pescado, atividade antibacteriana.

ABSTRACT

Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) is one of the most popular farmed fishes in the world, has excellent adaptation and reproduction in lentic environments and possess high-quality fillet. Apart from the clean and edible parts of the fish, there is a substantial amount of fish waste. Often this waste remainder is dumped at rivers, causing an imbalance of nutrients followed by pollution. Tilapia carcasses and viscera have a high protein value being used to make food for aquatic organisms. The use of fish waste decreases the risk of environmental pollution and generates economic revenues. Researchers have shown that waste material can be used to recover useful compounds including proteins that have antimicrobial activities. The present work reports the presence of trypsin inhibitor in tilapia liver, stomach and intestine as well as purification of *O. niloticus* trypsin inhibitor (OnTI) and antibacterial activity from liver, viscera of highest specific trypsin inhibitor activity. Viscera were separated and homogenized with 0.15 M NaCl and homogenates were treated with ammonium sulphate. Precipitate and supernatant fractions were evaluated for protein concentration, heated at 80 °C by 1 h and evaluated for trypsin inhibitor activity. The 20-40% precipitated fraction from liver (LF20-40) of highest specific trypsin inhibitor activity was used for inhibitor purification and in the antibacterial assays; minimal inhibitory (MIC) and bactericide (MBC) protein concentrations were determined. Ammonium sulphate fractions from liver and stomach showed trypsin inhibitor activity higher than fractions from intestine. *O. niloticus* trypsin inhibitor (OnTI) bound to trypsin-Agarose column was eluted with 0.5 M KCl-HCl pH 2.0; OnTI showed specific activity of 950 U/mg and two polypeptide bands on SDS-PAGE. Antibacterial activity on *S. aureus* was detected for LF20-40 (MIC: 0.09 mg/mL; MBC: 0.76 mg/mL); the fraction was also able to inhibit growth of *K. pneumoniae* (MIC: 1.53 mg/mL) but did not show antibacterial activity against *E. coli*. The results revealed that tilapia liver and stomach contain trypsin inhibitor. The effect of tilapia liver preparation on *S. aureus* and *K. pneumoniae* indicates that this viscera, usually discarded as waste, is a potential source of antibacterial agent.

Keywords: *Oreochromis niloticus*; trypsin inhibitor; fish waste; antibacterial activity.

1 INTRODUÇÃO

1.1 Proteases

Proteases ou enzimas proteolíticas são moléculas que catalisam a clivagem hidrolítica de ligações peptídicas presentes em substratos protéicos ou peptídicos; esta clivagem resulta em ativação, inativação funcional, proteólise limitada ou na digestão da molécula em questão. As enzimas proteolíticas estão presentes em vários tecidos de animais, plantas e microorganismos (MACEDO *et al.*, 2000). Um grande número de proteases é encontrado nos mamíferos. Essas enzimas participam de diversos processos como digestão dos alimentos, destruição da matriz extracelular, cicatrização dos tecidos, renovação tecidual, processamento de hormônios e enzimas, bem como interferem em vias inflamatórias e em cascatas de reações que levam à ativação do sistema complemento, da cascata de coagulação e da fibrinólise (TWINING, 1994).

A União Internacional de Bioquímica classifica as proteases em grupos, baseada em sua função, especificidade, estrutura tridimensional, comparação dos sítios ativos e mecanismo catalítico (GROZONKA, 2001; POWERS, 2002). Dependendo do mecanismo que utilizam para hidrolisar ligações peptídicas, as proteases são classificadas em quatro principais classes, denominadas: cisteíno, aspártico, metalo e serinoproteases. Entre essas classes há seis famílias de proteases: serinoproteases I e II, cisteinoproteases, asparticoproteases e metaloproteases I e II. Cada família tem uma característica comum de resíduos de aminoácidos funcionais arranjados numa configuração específica formando o sítio ativo (KOIWA *et al.*, 1997; POWERS *et al.*, 2002). Dessas classes, a mais intensamente estudada e melhor caracterizada é a das serinoproteases.

1.1.1 Serinoproteases

As serinoproteases são enzimas que possuem um mecanismo catalítico caracterizado pela presença de um grupamento serino no seu centro ativo e apresentam uma ampla distribuição entre os animais, onde são produzidas em diferentes tecidos e com diversas funções (BEZERRA *et al.*, 2001). Essa classe de proteases inclui moléculas que estão envolvidas em muitos processos fisiológicos tais como: digestão, desenvolvimento, processos inflamatórios,

proliferação celular, diferenciação, permeabilidade vascular, reabsorção óssea e coagulação (POWERS, 2002).

As principais enzimas que constituem a família das serinoproteases I são: tripsina (Figura 1), quimiotripsina, elastase, calicreína pancreática e trombina; o principal representante das serinoproteases II é a subtilisina (DUNN, 1989; NEARATH, 1989).



Fonte: <http://www2.bioqmed.ufrj.br/enzimas/proteases2.htm>.

Figura 1. Estrutura tridimensional da tripsina, enzima da família das serinoproteases I.

A atividade das serinoproteases é bloqueada por meio de uma forte ligação entre o inibidor e o sítio ativo da enzima, resultando em um complexo resistente à proteólise (LASKOWSKI e KATO 1980, BODE e HUBER 1992). Em animais aquáticos, a tripsina cliva as proteínas ou peptídeos nas ligações entre os aminoácidos lisina e arginina; a quimiotripsina cliva ligações entre fenilalanina, triptofano e tirosina; a elastase cliva as ligações formadas entre resíduos neutros e pequenos. Essas enzimas compreendem, entre os teleósteos, as proteases do trato digestivo mais estudadas da família das serinoproteases I (DE VECCHI e COPPES, 1996; VALUEVA e MOSOLOV, 1999).

As serinoproteases estão envolvidas em uma ampla variedade de processos biológicos que são essenciais para a vida, mas elas podem também ser prejudiciais caso não sejam controladas (LASKOWSKI JR e QUASIM, 2000). Por isso, sua atividade é estritamente regulada no momento fisiológico e no tecido em que atua.

Há pelos menos três principais mecanismos que regulam a atividade das enzimas proteolíticas. O primeiro envolve o controle da expressão gênica, o segundo envolve sua

síntese. O terceiro mecanismo é baseado no controle das enzimas proteolíticas ativas por meio de inibidores de protease (LASKOWSKI JR e QUASIM, 2000).

1.1.2 Protease em peixes

Existe uma alta diversidade em espécies no ambiente aquático, sobretudo nas regiões tropicais, onde as condições climáticas favorecem o seu desenvolvimento. A subclasse Teleosti é composta de 50 ordens, incluindo cerca de 7.000 espécies de água doce e 13.000 de água salgada conhecidas até o momento. Em teleósteos, as proteases digestivas são amplamente encontradas em suas vísceras.

A primeira protease de peixe a ser cristalizada foi uma pepsina de salmão, em 1940 (NORRIS e ELAM, 1940). Poucas proteases de peixes de água doce têm sido estudadas e, geralmente, essas enzimas têm sido descritas para peixes que habitam regiões temperadas onde predominam baixas temperaturas (DE VECCHI e COPPES, 1996; VALUEVA e MOSOLOV, 1999). Existe uma enorme defasagem em informações sobre proteases de peixes dulciaquícolas de regiões tropicais e suas aplicações.

Tripsinas também foram isoladas a partir de diversos animais aquáticos. O pH ótimo de sua atividade fica geralmente entre os valores de 7,0 a 9,0, podendo chegar a 10. Ao contrário das tripsinas de mamíferos, são estáveis em meio alcalino. A termoestabilidade, de um modo geral, é maior do que nos mamíferos (KOLODZIEJSKA e SIKORSKI, 1996).

1.2 Inibidores de Proteases

Inibidores de protease formam um grupo de proteínas ou peptídeos encontrados em várias espécies animais (STOKER *et al*, 1991; EGUCHI, 1993; CHRISTENSEN e SOTTRUP-JENSEN, 1994), microorganismos e plantas (RYAN, 2000; BIRK, 2003). Essas moléculas produzem um complexo estequiométrico com proteases, sendo assim, capazes de inibir a atividade catalítica mantendo a homeostase interna (VALUEVA e MOSOLOV, 1999).

Inibidores de proteases têm sido estudados como sistemas modelo para elucidar os mecanismos de inibição das proteases, bem como para entender as associações proteína-proteína. Sendo considerados fatores anti-nutricionais, acredita-se que os inibidores participem de várias funções fisiológicas, como a regulação das cascatas proteolíticas e o

armazenamento seguro de proteínas, bem como atuam como moléculas de defesa (BIRK, 2003; SUMIKAWA *et al.*, 2008).

A regulação da atividade proteolítica por inibidores de proteinases é um processo comum na natureza. Inibidores ligam-se fortemente ao sítio ativo das proteinases por meio de uma pequena porção de superfície da molécula denominada sítio reativo ou sítio inibitório. Esta ligação ocorre de modo semelhante ao da ligação do substrato. A inibição decorre da não ligação do substrato à protease devido ao impedimento estereoquímico provocado pela ligação do inibidor à enzima (LASKOSWISKI JR. e KATO, 1980, BODE e HUBER, 1992; BIETH, 1995; GARCIA-CARREÑO, 1996).

Os inibidores de protease são conhecidos por desempenharem um papel importante na imunidade de animais (KANOST e JIANG, 1996; CERENIUS *et al.*, 2008). Eles regulam a atividade de proteases envolvidas na coagulação de hemolinfa, a ativação da profenoloxidase (proenzima inativa da fenoloxidase, um importante mediador do sistema de defesa dos insetos), e na síntese de citocinas e peptídeos antimicrobianos (MIURA *et al.*, 1994; TONG e KANOST, 2005).

Alexander e Ingram (1992) revisaram os mecanismos de defesa não-específicos em peixes e sugeriram que os inibidores de protease funcionam como substâncias de defesa. Além disso, muitos inibidores de protease protegem os hospedeiros por inativar diretamente proteases dos patógenos (BOUCIAS e PENDLAND, 1987; ABRAHAM *et al.*, 2005),

Em plantas, fazem parte do sistema químico de defesa, por inibição extracelular de enzimas, podem retardar ou prevenir a invasão de seus tecidos por microorganismos saprófitos ou parasitas tais como fungos e bactérias (LASKOWSKI JR e QUASIM, 2000).

1.2.1 Inibidores de serinoproteases

Serinoproteases e seus inibidores naturais são modelos mais intensamente estudados de reconhecimento proteína-proteína. Essas moléculas são de grande interesse, pois atuam como moduladores, desempenhando papel-chave em várias funções fisiológicas (BRAUN e SCHNEBLI, 1986).

Todas as proteínas desta classe são inibidores competitivos que inibem proteases com um mecanismo de padrão similar (LASKOWSKI JR e QUASIM, 2000). Essa classe compreende proteínas constituídas por 29 a 200 resíduos de aminoácidos que apresentam alta especificidade e possuem uma alça hidrofóbica característica (BODE e HUBER, 1992).

Inibidores específicos evoluíram para limitar a atividade proteolítica de cada um dos grupos de proteases. Existem pelo menos, quatro famílias de inibidores de serinoproteases: as serpinas, os do tipo Kunitz, os do tipo Kazal e as leuco-proteases (TRAVIS e SALVESEN, 1983). Embora essas famílias apresentem diferenças quanto à estrutura, muitos dos inibidores de serinoproteases interagem com suas enzimas alvo de acordo com o seguinte mecanismo: ocorre a ligação do sítio ativo da protease com o sítio inibidor e a quebra de uma ligação peptídica dentro desse sítio para formar um inibidor modificado. O sítio reativo do inibidor é uma região semelhante ao substrato da enzima e, dessa forma, o inibidor de serinoprotease atua como um pseudo-substrato (TRAVIS e SALVENSEN, 1983).

Bode e Huber (2000) também discutiram o mecanismo de ação geral de inibidores de serinoproteases através de uma interação enzima-substrato. Nessa interação, o inibidor bloqueia o sítio ativo da enzima (Figura2), ligando-se a esta de maneira estável, impedindo sua ligação com o substrato e, conseqüentemente, sua atividade hidrolítica.



Figura 2. **Mecanismo de inibição de serinoproteases.**
(Adaptado de Bode e Huber, 2000)

1.2.2 Importância e Aplicação dos Inibidores

Os inibidores de proteases têm sido estudados em detalhes devido a sua ampla aplicação e importância. Essas moléculas são utilizadas como instrumentos de investigação do mecanismo enzimático e no desenvolvimento de drogas para o tratamento de uma ampla série de patologias tais como: pancreatite, distúrbios de coagulação, alergia, inflamação e certos cânceres (DECLERCK *et al.*, 1994; OLIVA *et al.*, 2000). Podem desempenhar papel anti-inflamatório (MARGET *et al.*, 1999), efeitos inibitórios sobre a atividade gelatinolítica do esperma (LI *et al.*, 2009) e, assim como as proteases, são fatores de virulência importantes (LANTZ, 1997; KLEMBA e GOLDBERG, 2002).

1.2.2.1 Inibidor de protease e atividade antibacteriana

O crescente problema da resistência aos convencionais antibióticos tem estimulado a necessidade de desenvolver novos produtos para terapêutica humana (ZASLOFF, 2002). Várias bactérias são conhecidas pela produção de proteinases extracelulares e se destacam por possuírem um papel ativo no desenvolvimento de várias doenças. Diversas linhas de evidência sugerem que uma importante função de inibidores proteases é combater a proteinases de patógenos (CHRISTELLER, 2005).

Devido à especificidade e versatilidade dos inibidores de proteases, as ciências médica e farmacêutica têm explorado seu potencial aplicativo como agentes antifúngicos, antiprotozoários, antivirais e, sobretudo, antibacterianos frente a bactérias Gram-negativas e positivas com importância na clínica médica (FEAR *et al.*, 2007).

Análises comparativas e funcionais sugerem que inibidores de serinoproteases podem ter um antepassado comum com peptídeos antimicrobianos (CONLON *et al.*, 2004). Augustin *et al.* (2009) estudaram inibidores que inibiam proteases microbiana e possuíam potente atividade bactericida contra *Staphylococcus aureus* in vitro.

1.2.3 Inibidores em Peixes

Alexander e Ingram (1992), revisando os mecanismos de defesa não específicos em peixe, sugeriram que os inibidores de proteases funcionam como substâncias de defesa. Inibidores de protease, tais como, inibidor de $\alpha 2$ -macroglobulina, inibidor de $\alpha 1$ -proteinase e

inibidor de serpinas têm sido identificados em soro de peixes (STARKEY e BARRETT, 1982; HJELMELAND, 1983; FREEDMAN, 1991; ARANISHI, 1999a,b); inibidores de tripsina em músculo (BUSCONI *et al.*, 1984) e muco da pele de peixes (NAGASHIMA *et al.*, 2004); inibidores de cisteinoproteases na pele de peixes (SYNNES, 1998; YLONEN *et al.*, 1999, SAITOH *et al.*, 2005). No entanto ainda são poucas as informações a respeito da presença de inibidores de proteases nos demais tecidos.

1.3 Tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*)

A tilápia do Nilo, *Oreochromis niloticus* Linn. (Figura 3), nativo da África Continental e da Palestina, Vale do rio Jordão e rios costeiros (CORREIA *et al.*, 2006), é o peixe mais criado em todo o mundo e tem sido introduzido em vários países (WATANABE *et al.*, 2002).



Fonte: Folha UOL, ciências, 2007.

Figura 3. Tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*).

Em razão de seu potencial, muitos aspectos relacionados ao manejo e à nutrição têm sido estudados (MEURER *et al.*, 2003a). É o segundo peixe exótico mais importante na aquicultura brasileira (BEZERRA *et al.*, 2005). Os cultivos de tilápia se intensificaram particularmente no Nordeste e Sudeste do país, aumentando de 35 mil toneladas em 2001 para 68 mil toneladas em 2005 (KUBITZA, 2007). *O. niloticus* é uma espécie rústica, apresentando carne de excelente sabor e filé de alta qualidade, responsáveis pela sua boa aceitação pelo mercado consumidor (MEURER *et al.*, 2003).

A indústria de processamento de tilápias iniciou suas atividades no Brasil na década de 90, no Oeste do Paraná, priorizando a produção de filés “in natura” e congelados. Nesse contexto, a comercialização de tilápias gerou a produção de resíduos nos frigoríficos, principalmente provenientes na produção de filetagem (Figura 4). Segundo Meurer *et al.*, (2003), a produção de filés utiliza entre 62,5 e 66,5% da matéria prima, sendo fundamental o processamento dos resíduos para a redução do impacto ambiental.



Fonte: <http://mybelojardim.com>

Figura 4. Resíduos de Processamento de Pescado

1.3.1. Aproveitamento de resíduos da filetagem de tilápia

O aproveitamento dos resíduos gerados pelas indústrias surge como uma alternativa para tornar o setor mais sustentável ao longo da cadeia produtiva, trazendo melhorias sociais, econômicas e ambientais (ROSA, 2009).

Pensando na melhor forma de diminuir os problemas ambientais, o aproveitamento das vísceras da tilápia tem sido estudado; dentre as formas de aproveitamento desses resíduos está a produção de farinha de peixe como insumo na fabricação de rações balanceadas, (FARIA *et al.*, 2001). A farinha de peixe é obtida a partir dos resíduos (vísceras e carcaças) gerados na industrialização da tilápia. As características qualitativas e quantitativas da farinha dependem

das características da matéria-prima utilizada no processamento (ARRUDA et al., 2004). Esse tipo de alimento pode apresentar, no entanto, um valor considerável de inibidores de proteases capazes de provocar efeitos fisiológicos adversos ou diminuir a biodisponibilidade de nutrientes (SILVA e SILVA, 2000). Embora a indústria tente eliminar estes fatores, ainda são encontrados elevados níveis de inibidores de proteases (SOARES *et al.*, 2008).

Entretanto, esses inibidores encontrados nas vísceras de animais aquáticos também possuem características benéficas muito importantes, podendo ser utilizados alternativamente por possuírem alto poder antibacteriano frente a microrganismos patogênicos de importância clínica na área médica (LANDSBERG, 2002).

2. JUSTIFICATIVA

A tilápia do Nilo, depois da carpa, é o segundo peixe exótico mais importante na aquicultura brasileira, representando cerca de 3% do total da produção mundial com um crescimento médio anual de 12% (BEZERRA *et al.*, 2005). Este peixe possui características bastante desejáveis, tais como, boa aceitação e elevado valor comercial, excelente conversão alimentar e, conseqüentemente, custos de produção relativamente baixos, o que é de grande importância, especialmente para os povos dos países em desenvolvimento. Como utiliza alimentos de alto teor de proteína vegetal, a tilápia tem elevada qualidade para o consumo humano, despertando, desta forma, grande interesse dos piscicultores para seu cultivo.

A indústria de filetagem de tilápias gera grande quantidade de resíduos, produzindo cerca de 30% de resíduos constituídos por cabeça, nadadeiras, vísceras, pele e escamas, coluna vertebral e aparas. Estes materiais, ricos em nutrientes, têm sido bem aproveitados para a confecção de farinha de alto valor protéico usada na composição de rações industriais para alimentação de organismos aquáticos em diversos sistemas de cultivo, contribuindo dessa forma, com a diminuição da poluição ambiental gerada pelo não aproveitamento desses resíduos. Entretanto, é comum encontrar alimentos protéicos contendo fatores antinutricionais e de baixa digestibilidade (FARIA *et al.*, 2001), tais como os inibidores de proteases (SILVA E SILVA, 2000).

Os inibidores de proteases podem interferir no processo de hidrólise dos alimentos (BIETH, 1995). Esses inibidores podem estar presentes em vísceras de peixes, que são muito utilizadas como ração para alimentação de alevinos e peixes adultos (FARIA *et al.*, 2001). No presente trabalho foi parcialmente purificado e caracterizado o inibidor de protease (tripsina) presente em maior atividade em fígado do peixe tilápia do Nilo (*O. niloticus*) no intuito de obter um melhor aproveitamento dos resíduos gerados pela filetagem da tilápia diminuindo, assim, a degradação do meio ambiente. Além disso, a atividade antibacteriana foi avaliada como uma alternativa de uso dessas amostras.

3. REFERÊNCIAS

- ALEXANDER, J.B.; INGRAM, G.A. Non-cellular non-specific defense mechanisms of fish. Annual. Review. Fish Disease, 2, 249–79. 1992.
- ARRUDA, L.F. Aproveitamento do resíduo do beneficiamento da tilápia do Nilo para obtenção de silagem e óleo como subprodutos. Dissertação Mestrado – Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2004.
- ABRAHAM, E.G.; PINTO, S.B.; GHOSH, A.; VANLANDINGHAM, D.L.; BUDD, A.; HIGGS, S.; JACOBS-LORENA, M.; MICHEL, K. An immune-responsive serpin, SRPN6, mediates mosquito defense against malaria parasites. Proceedings of the Nacional Academy of Sciences of the United States of America, 102(45), 16327–32, 2005.
- ARANISHI, F. Purification and characterization of α 1-proteinase inhibitor from carp (*Cyprinus carpio*) serum. Marine Biotechnology, 1, 33–43, 1999a.
- ARANISHI, F. Purification and characterization of serum serpin from carp (*Cyprinus carpio*). Marine Biotechnology, 1, 81–88, 1999b.
- AUGUSTIN, R.; SIEBERT, S.; BOSCH, T.C. Identification of a Kazal-type serine protease inhibitor with potent anti-staphylococcal activity as part of Hydra's innate immune system. Developmental & Comparative Immunology, 33(7), 830-7, 2009.
- BEZERRA, R.S.; VIEIRA, V.L.A.; CARVALHO JR, L.B. Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento, 22, 46-49, 2001.
- BEZERRA, R.S.; LINS, E.J.F.; ALENCAR, R.B.; PAIVA, P.M.G.; CHAVES M.E.C.; COELHO, L.C.B.B.; CARVALHO JR. L.B. Alkaline proteinase from intestine of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). Process Biochemistry, 40, 1829–34, 2005.
- BIRK, Y. In: Plant Protease Inhibitors: Significance in Nutrition, Plant Protection, Cancer Prevention and Genetic Engineering. ed. (Berlin Heidelberg: Springer-Verlag), 1–126, 2003.
- BIETH, J.G. Theoretical and practical aspects of proteinase inhibition kinetics. Method Enzymology, 248, 59-84, 1995.
- BODE, W.; HUBER, R. Natural protein proteinase inhibitors and their interaction with proteinases. European Journal of Biochemistry, 204(2), 433–451, 1992a.
- BODE, W.; HUBER, R. Structural basis of the proteinase-protein inhibitor interaction. In: Avilés, F.X. Innovations in proteases and their inhibitors. New York, Walter de Gruyter, 81-122, 1992b.
- BOUCIAS, D.G.; PENDLAND, J.C. Detection of protease inhibitors in the hemolymph of resistant *Anticarsia gemmatilis* which are inhibitory to the entomopathogenic fungus, *Nomuraca rileyi*. Experientia, 43, 336–9, 1987.

BRAUN, N.J.; SCHNEBLI, H.P. A brief review of the biochemistry and pharmacology of Eglin c, an elastase inhibitor. *European Journal of Respiratory Disease, Supplement*, 146, 541–47, 1986.

BUSCONI, L.; FOB, E.J.; MARTONE, C.; TRUCCO, R.E.; SGNCHÉZ, J.J. Identification of two alkaline proteases and a trypsin inhibitor from muscle of white croaker (*Micropogon opercularis*). *Federation of European Biochemical Societies*, 176(1), 211–14, 1984

CERENIUS, L.; LEE, B.L.; SODERHALL, K. The proPO-system: pros and cons for its role in invertebrate immunity. *Trends Immunology*, 29, 263–71, 2008.

CHRISTELLER, J. T. Evolutionary mechanisms acting on proteinase inhibitor variability. *European Journal of Biochemistry*, 272, 5710–5722, 2005.

CHRISTENSEN, S.; SOTTRUP-JENSEN, L. Characterization of two serpins from bovine plasma and milk. *The Biochemical Journal*, 303(2), 383–90, 1994.

CORREIA, A.P.; MORAES ALVES, A.R.; LOPES, J.P.; SANTOS, F.L.B. Reversão sexual em larvas de tilápia-do-nilo, *Oreochromis niloticus* (Linnaeus, 1766), em diferentes condições ambientais. *Revista Brasileira de Engenharia de Pesca*, 1(1), 54–64, 2006.

CONLON, J. M.; KOŁODZIEJEK, J.; NOWOTNY, N. Antimicrobial peptides from ranid frogs: taxonomic and phylogenetic markers and a potential source of new therapeutic agents. *Biochimica et Biophysica Acta* 1696, 1–14, 2004.

DECLERCK, Y.A.; IMREN, S. Protease inhibitors: role and potencial therapeutic use in human cancer. *European Journal Cancer*, 30A, 2170–80, 1994.

DE VECCHI, S; COPPES, Z. Marine fish digestive proteases - Relevance to food industry and the southwest Atlantic region - A review. *Journal of Food Biochemistry*, 20(1), 193–214, 1996.

DUNN, B.M. Determination of protease mechanism. In: BEYNON, R.J.; BOND, J.S. (eds.) *Proteolytic enzymes*. Oxford, IRL Press, 57–81, 1989.

EGUCHI, M. Protein protease inhibitors in insects and comparison with mammalian inhibitors. *Comparative Biochemistry and Physiology*, 105B, 449–56, 1993.

FARIA, A.C.E.A.; HAYASHI, C.; GALDIOLI, E.M.; SOARES, C.M. Farinha de peixe em rações para alevinos de tilápia do Nilo, *Oreochromis niloticus* (L.), linhagem tailandesa. *Acta Scientiarum*, 23(4), 903–8, 2001.

FEAR, G.; KOMARNYTSKY, S.; RASKIN, I. Protease inhibitors and their peptidomimetic derivatives as potential drugs. *Pharmacology & Therapeutics*, 113, 354–368, 2007.

FREEDMAN, S.J. The role of alpha 2-macroglobulin in furunculosis: a comparison of rainbow trout and brook trout. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B*, 98, 549–553, 1991.

GARCIA-CARRENO, F. Proteinase inhibitors. *Friends Food Science Technology*, 7, 197-204, 1996.

GROZONKA, Z.; JANKOWSKA, E.; KASPRZYKOWSKI, F.; KASPRZYKOWSKA, R.; LANKIEWICZ, L.; WICZK, W.; WIECZERZAK, E.; CIARKOWSKI, J.; DRABIK, P.; JANOWSKI, R.; KOZAK, M.; JASKOLSKI, M.; GRUBB, A. Structural studies of cysteine proteases and their inhibitors, *Acta Biochimica Polonica*, 48(1), 1-20, 2001.

HJELMELAND, K. Protease inhibitors in the muscle and serum of cod (*Gadus morhua*). Isolation and characterization. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part B*, 76, 365–72, 1983.

KANOST, M.R.; JIANG, J. Proteinase inhibitors in invertebrate immunity. In: SODERHALL, K.; IWANAGA, S.; VASTA, G.R. (editors). *New directions in invertebrate immunology*. Fair Haven, NJ: SOS Publications, 155–73, 1996.

KLEMB, M.; GOLDBERG, D.E. Biological roles of proteases in parasitic protozoa. *Annual Review of Biochemistry*, 71, 275–305, 2002.

KOŁODZIEJSKA, I.; SIKORSKI, Z. E. The digestive proteases of marine fish and invertebrates. *Bull. Sea Fish Institute*, 137(1), 51-56, 1996.

KOIWA, H.; BRESSAN, R.A.; HASEGAWA, P.M. Regulation of protease inhibitors and plant defense. *Trends in plant science*, 2(10), 379-84, 1997.

KUBITZA, F. A produção de pescado no mundo e a aquicultura. *Revista Panorama da Aquicultura*. Rio de Janeiro, 17, 2007.

LI, Y.; QIAN, Y.Q.; MA, W.M.; YANG, W.J. Inhibition mechanism and the effects of structure on activity of male reproduction-related peptidase inhibitor Kazal-type (MRPINK) of *Macrobrachium rosenbergii*. *Marine Biotechnology*, 11(2), 252-9, 2009.

LANTZ, M.S. Are bacterial proteases important virulence factors? *Journal of Periodontal Research*, 32(1,2), 126–32, 1997.

LASKOWSKI, M. JR.; QUASIM, M.A. What can the structures of enzyme-inhibitor complexes tell us about the structures of enzyme substrate complexes? *Biochemical et Biophysica Acta*, 1477, 324-337, 2000.

LANTZ, M.S. Are bacterial proteases important virulence factors? *The Journal of Periodontal Research*, 32, 126–32, 1997.

LANDSBERG, G.J.H. *Reviews in Fisheries Science*, 10, 113, 2002.

LASKOWSKI, M. JR.; KATO, I. Protein inhibitors of proteinases. *Annual Review of Biochemistry*, 49, 685-93, 1980.

MACEDO, M.L.R.; MATOS, D.G.; MACHADO, O.L.T.; NOVELLO, J.C. Trypsin inhibitor from *Dimorphandra mollis* seeds: purification and properties. *Phytochemistry*, 54, 553-58, 2000.

MAGERT, H.J.; STANDKER, L.; KREUTZMANN, P.; ZUCHT, H.D.; REINECKE, M.; SOMMERHOFF, C.P.; FRITZ, H.; FORSSMANN, W.G. LEKTI, a novel 15-domain type of human serine proteinase inhibitor. *The Journal of Biology Chemistry*, 274(31), 21499-502, 1999.

MIURA, Y.; KAWABATA, S.; IWANAGA, S. A limulus intracellular coagulation inhibitor with characteristics of the serpin superfamily. Purification, characterization, and cDNA cloning. *The Journal of biological chemistry*, 269, 542–7, 1994.

NAGASHIMA, Y.; TAKEDA, M.; OHTA, I.; SHIMAKURA, K.; SHIOMI, K. Purification and properties of proteinaceous trypsin inhibitors in the skin mucus of pufferfish *Takifugu pardalis*. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part B*, 138, 103– 10, 2004.

NEURATH, H. The regulation of proteinase action. In: Avilés, F.X. *Innovations in protease and their inhibitors*. New York, Walter de Gruyter, 3-12, 1989.

NORRIS, E. R.; ELAM, D. W. Preparation and properties of crystalline salmon pepsin. *Journal of Biological Chemistry*. 134, 443-454, 1940.

MEURER, F.; HAYASHI, C.; BOSCOLO, W.R. Influência do processamento da ração no desempenho e sobrevivência da tilápia do Nilo durante a reversão sexual. *Revista Brasileira de Zootecnia*, 32(2), 262-67, 2003.

OLIVA, M.L.V.; SOUZA-PINTO, J.C.; BATISTA, I.F.C.; ARAÚJO, M.S.; SILVEIRA, V.F.; AUERSWALD, E.A.; MENTELE, R.; ECKERSKORN, C.; SAMPAIO, M.U.; SAMPAIO, C.A.M. *Leucaena leucocephala* serine proteinase inhibitor: primary structure and action on blood coagulation, kenin release and rat paw edema. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1477, 64-74, 2000.

POWERS, L.C.; ASGIAN, J.L.; EKICI, O.C.; JAMES, K.E. Irreversible inhibitors of serine, cysteine and threonine proteases. *Chemical Reviews*, 102, 4639-750, 2002.

RYAN, C.A. The systemin signaling pathway: differential activation of plant defensive genes. *Biochimica et Biophysica Acta* 1477(1-2), 112–121, 2000.

ROSA, M.J.S. (2009). Aproveitamento integral dos resíduos da filetagem de tilápia e avaliação do impacto econômico. Jaboticabal: Centro de Aquicultura, Universidade Estadual Paulista.

SAITOH, E.; ISEMURA, S.; CHIBA, A.; OKA, S.; ODANI, S. A novel cysteine protease inhibitor with lectin activity from the epidermis of the Japanese eel *Anguilla japonica*. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part B*, 141, 103–9, 2005.

SILVA, M. R.; SILVA, M. A. A. P. Antinutritional Factors: Protease Inhibitors and Lectins. *Revista de Nutrição, Campinas*, 13(1), 3-9, 2000.

SYNNES, M. Purification and characterization of two cysteine proteinase inhibitors from the skin of Atlantic salmon (*Salmo salar L.*). *Comparative Biochemistry and Physiology, Part B*, 121, 257–64, 1998.

SOARES, E.C.; PEREIRA FILHO, M.; ROUBACH, R.; SOARES E SILVA, R.C. Protease exógena em dietas para juvenis de tucunaré-paca (*Cichla sp.*). *Revista Brasileira de Zootecnia*, 37(6), 2008.

STARKEY, P.M.; BARRETT, A.J. Evolution of α 2-macroglobulin. *Journal of Biochemistry*, 205, 91–95, 1982.

STOKER, W.; BREIT, S.; SOTTRUP-JENSEN, L.; ZWILLING, R. α 2-Macroglobulin from the hemolymph of the freshwater crayfish *Astacus astacus*. *Comparative Biochemistry and Physiology*, 98B, 501–9, 1991.

SUMIKAWA, J.T.; BRITO, M.V.; ARAUJO, A.P.U.; MACEDO, M.L.R.; OLIVA, M.L.V.; MIRANDA, A. Action of *Bauhinia*-derivated compounds on *Callosobruchus maculatus*. In: DEL VALLE, S.; ESCHER, E.; LUBELL, W.D. (Org), *Peptides for Youth*. New York, NY: American Peptide Society, 611–13, 2008.

TRAVIS, J.; SALVESEN, G.S. Human plasma proteinase inhibitors. *Annual Review of Biochemistry*, 52, 655–709, 1983.

TWINING, S.S. Regulation of proteolytic activity in tissues. *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology*, 29(5), 315–83, 1994.

TONG, Y.; KANOST, M.R. *Manduca sexta* serpin-4 and serpin-5 inhibit the prophenoloxidase activation pathway: cDNA cloning, protein expression, and characterization. *The Journal of biological chemistry*, 280, 14923–31, 2005.

VALUEVA, T.A.; MOSOLOV, V.V. Protein inhibitors of proteinases in seeds: 1. Classification, distribution, structure, and properties. *Journal of Plant Physiology*, 46(3), 307–321, 1999.

WATANABE, O.W.; LOSORDO, T.M.; FITZSIMMONS, K.; HANLEY, F. Tilápia production systems in the Américas: technological advances, trends and challenges. *Reviews in Fisheries Science*, 10(3–4), 465–498, 2002.

YLONEN, A.; RINNE, A.; HERTTUAINEN, J.; BOGWALD, J.; JARVINEN, M.; KALKKINEN, N. Atlantic salmon (*Salmo salar L.*) skin contains a novel kininogen and another cystein proteinase inhibitor. *European Journal of Biochemistry*, 266, 1066–72, 1999.

ZASLOFF, M. Antimicrobial peptides of multicellular organisms. *Nature* 415, 389–395, 2002.

ZHENG, Q.L.; CHEN, J.; NIE, Z.M.; LV, Z.B.; WANG, D.; ZHANG, Y.Z. Expression, purification and characterization of a three-domain Kazal-type inhibitor from silkworm pupae (*Bombyx mori*). *Comparative Biochemistry and Physiology Part B, Biochemistry and Molecular Biology*, 146(2), 234–40, 2007.

4. OBJETIVOS

4.1 Objetivo Geral

Investigar a presença de atividade inibidora de tripsina em preparações protéicas de fígado, estômago e intestino do peixe *O. niloticus* (tilápia), bem como purificar e caracterizar a atividade inibidora de tripsina presente nas preparações de fígado e determinar seu efeito sobre linhagens de bactérias Gram-positivas e Gram-negativas.

4.2 Objetivos Específicos

- Obter homogenatos de fígado, estômago e intestino de *O. niloticus* em NaCl 0,15M.
- Obter frações ricas em proteínas a partir de cada homogenato por tratamento com sulfato de amônio.
- Determinar a concentração de proteínas nas frações obtidas.
- Desnaturar proteases presentes nas preparações de fígado, estômago e intestino de *O. niloticus* por tratamento térmico.
- Avaliar as frações quanto à presença de atividade inibidora de tripsina.
- Purificar o inibidor de tripsina de *O. niloticus* (OnTI) presente em fração protéica de fígado (20-40%) por cromatografia de afinidade em coluna de Tripsina-Agarose.
- Determinar o perfil eletroforético, em gel de poliacrilamida, de OnTI em presença de sulfato sódico de dodecila.
- Determinar o efeito de fração de fígado de *O. niloticus*, contendo atividade inibidora de tripsina, sobre bactérias de importância médica (*Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* e *Klebsiella pneumoniae*) e determinar os valores de CMI (concentração mínima inibitória) e CMB (concentração mínima bactericida).

5. CAPÍTULO I

Book Chapter: Environment Research Updates

Trypsin inhibitor and antibacterial activities from liver of tilapia fish (*Oreochromis niloticus*)

Kaleen M. Leite, Emmanuel V. Pontual, Thiago H. Napoleão, Francis S. Gomes, Elba V.M. Maciel-de-Carvalho, Patrícia M.G. Paiva, Luana C.B.B. Coelho*

Departamento de Bioquímica, Centro de Ciências Biológicas, Avenida Professor Moraes Rego, s/n, 50670-420, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, Brazil.

*Corresponding author: Tel: +558121268540; Fax: +558121268576

E-mail address: lcbccoelho@gmail.com

ABSTRACT

Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) is one of the most popular farmed fishes in the world, has excellent adaptation and reproduction in lentic environments and possess high-quality fillet. Apart from the clean and edible parts of the fish, there is a substantial amount of fish waste. Often this waste remainder is dumped at rivers, causing an imbalance of nutrients followed by pollution. Tilapia carcasses and viscera have a high protein value being used to make food for aquatic organisms. The use of fish waste decreases the risk of environmental pollution and generates economic revenues. Researchers have shown that waste material can be used to recover useful compounds including proteins that have antimicrobial activities. The present work reports the presence of trypsin inhibitor in tilapia liver, stomach and intestine as well as purification of *O. niloticus* from live trypsin inhibitor (OnTI) and antibacterial activity from liver, viscera of highest specific trypsin inhibitor activity. Viscera were separated and homogenized with 0.15 M NaCl and homogenates were treated with ammonium sulphate. Precipitate and supernatant fractions were evaluated for protein concentration, heated at 80 °C by 1 h and evaluated for trypsin inhibitor activity. The 20-40% precipitated fraction from liver (LF20-40) of highest specific trypsin inhibitor activity was used for inhibitor purification and in the antibacterial assays; minimal inhibitory (MIC) and bactericide (MBC) protein concentrations were determined. Ammonium sulphate fractions from liver and stomach showed trypsin inhibitor activity higher than fractions from intestine. *O. niloticus* trypsin inhibitor (OnTI) bound to trypsin-Agarose column was eluted with 0.5 M KCl-HCl pH 2.0; OnTI showed specific activity of 950 U/mg and two polypeptide bands on SDS-PAGE. Antibacterial activity on *S. aureus* was detected for LF20-40 (MIC: 0.09 mg/mL; MBC: 0.76 mg/mL); the fraction was also able to inhibit growth of *K. pneumoniae* (MIC: 1.53 mg/mL) but did not show antibacterial activity against *E. coli*. The results revealed that tilapia liver and stomach contain trypsin inhibitor. The effect of tilapia liver preparation on *S. aureus* and *K. pneumoniae* indicates that this viscera, usually discarded as waste, is a potential source of antibacterial agent.

Keywords: *Oreochromis niloticus*; trypsin inhibitor; fish waste; antibacterial activity.

5.1 Introduction

Several species of fish are cultured around the world. Tilapia species are native of the Continental Africa and Palestine and are included among the most farmed due to their large size, rapid growth, palatability and high productivity (Popma and Lovshin, 1995). There are about seventy species of tilapia; the most commercial important belong to two genera: *Oreochromis* and *Sarotherodon*. *Oreochromis niloticus* (Nile tilapia) is a widely cultured species native from Africa which has been introduced in several tropical countries for aquaculture purposes due to the high quality, excellent taste and good acceptance of its fillet Nyingi et al., (2009). In addition, *O. niloticus* is able to reproduce and develop in different environmental conditions and tolerates stress induced by handling (Tsadik and Bart, 2007).

The tilapia filleting industry has generated a lot of by-products such as carcasses, heads and viscera, which have high content of minerals, protein and fat (Stevanato et al., 2008). According to Nyingi et al., (2009) the production of tilapia fillets utilizes between 62.5 and 66.5% of raw material; the fish farm waste generated are mainly dumped into rivers and can alter a wider coastal zone at different ecosystem levels, reducing the biomass, density and diversity of the benthos, plankton and nekton (Arvanitoyannis and Kassaveti, 2008). In this way, the exploitation of tilapia waste may bring benefits to the environment by the reuse of by-products reducing pollution. The reuse of generated waste makes the sector more sustainable over the production chain bringing social, economic and environmental improvements (Rosa, 2009).

Tilapia viscera are reused in the production of meal for aquatic organisms (Oetterer, 2003). Researchers have showed that waste material from fish farming have been used to recover bioactive compounds. Waste fish oil has been used to produce biofuel (Wisniewski Jr. et al., 2010) and natural antioxidants have been extracted and used by food industry

(Hinkamp, 1996). Cuttlefish liver waste was source of molecules with antimicrobial, antiatherogenic and antitumor activities (Joseph et al., 2006; Sherief et al., 2006).

Protease inhibitors are proteins or peptides that form stable complexes with the enzymes promoting inhibition of activity (Li et al., 2007). They exhibit a versatile role in biological systems and have been proposed as therapeutic (Koblinski et al. 2000; Fear et al., 2007), insecticide (Bhattacharyya et al., 2007, Ramos et al., 2009) and antimicrobial agents (Kim et al. 2009).

This work reports the presence of trypsin inhibitor activity in tilapia liver, stomach and intestine. Also are described the purification of *O. niloticus* trypsin inhibitor (OnTI) and antibacterial activity from fraction liver, viscera of highest specific trypsin inhibitor activity.

5.2 Materials and Methods

5.2.1 Fish material

O. niloticus (Phylum Chordata, Class Actinopterygii, Order Perciformes, Family Cichlidae) has the vernacular name of Nile tilapia. Juvenile specimens were kindly provided by the rearing units at the *Estação de Aquicultura Continental Prof. Johei Koike*, *Departamento de Aquicultura e Pesca* from the *Universidade Federal Rural de Pernambuco* (Recife, State of Pernambuco, Brazil).

5.2.2 *O. niloticus* viscera preparations

The specimens of tilapia were sacrificed in an ice bath; their viscera (liver, stomach and intestine) were surgically removed using a bistoury and immediately homogenized in 0.15 M NaCl (in proportion of 0.1 g/mL) at 4 °C. The homogenates were centrifuged (9,000 g, 4 °C, 20 min) and the supernatants were fractionated with ammonium sulfate (4 h at 4 °C)

at saturations of 0-20%, 20-40% and 40-60% according to Green and Hughes (1955); the precipitate fractions (F0-20, F20-40 and F40-60) and the final supernatants were collected; each acronym was preceded by the letters L, S or I when corresponding to samples from liver, stomach or intestine, respectively. The fractions were dialyzed (3.5 kDa cut-off membrane) against distilled water (4 h) and 0.15 M NaCl (4 h); following the protein content as well as trypsin inhibitor activity were determined.

5.2.3 Protein content

The protein concentration was determined according to Bradford (1976) using bovine serum albumin (31.25–500 mg/mL) as the standard protein.

5.2.4 Trypsin inhibitor activity

Fractions from liver, stomach and intestine were submitted to heating at 80 °C by 1 h and evaluated for trypsin-like activity using the synthetic substrate N-benzoyl-DL-arginyl-p-nitroanilide (BAPNA) as described by Kakade et al. (1969). Heating was able to eliminate the enzyme activity and the fractions were then evaluated for trypsin inhibitor activity using 0.1 mg/ml bovine trypsin (Sigma-Aldrich, USA) in 0.1 M Tris-HCl pH 8.0 containing 0.02 M CaCl₂. One unit of trypsin activity was defined as the amount of enzyme that hydrolyzes 1 µmol of BAPNA per minute. Bovine trypsin (5 µl; 0.1 mg/mL) was incubated (5 min, 37 °C) with *O. niloticus* preparations from each viscera (20 µl) in Tris-HCl buffer pH 8.0 (170 µl). Following, BAPNA (8 mM) dissolved in dimethyl sulfoxide was added (5 µl) and the mixture was incubated (30 min, 37 °C). The substrate hydrolysis was followed by measurement of absorbance at 405 nm and the inhibitory activity was determined by remaining hydrolytic activity towards BAPNA. One trypsin inhibitory unit (U) was defined as the number of trypsin activity units inhibited by sample.

5.2.5 Chromatography on Trypsin-Agarose column

The tilapia liver preparation with highest trypsin inhibitor activity (LF20-40) was lyophilized, resuspended in 0.1 M Tris-HCl pH 8.0 and loaded (25 mg of protein) onto Trypsin-Agarose (Sigma-Aldrich, USA) column (6 x 0.5 cm) equilibrated with 0.1 M Tris-HCl pH 8.0 (25 mL) at flow rate of 10 mL/h. The unadsorbed proteins were eluted with equilibrating solution until the absorbance at 280 nm was negligible. Then, the adsorbed proteins were eluted with 0.5 M KCl-HCl pH 2.0 (17 mL). The unadsorbed fractions were pooled and evaluated for protein concentration and trypsin inhibitor activity. The adsorbed fractions were pooled, dialyzed against distilled water (2 h) and 0.15 M NaCl (2 h) before determination of protein content and trypsin inhibitor activity.

5.2.6 Polyacrylamide gel electrophoresis

The chromatographic pools were submitted to polyacrylamide gel electrophoresis containing sodium dodecyl sulfate (SDS-PAGE) on 10 % (w/v) gel according to Laemmli (1970). Polypeptide bands were stained with 0.02% (v/v) Coomassie Brilliant Blue in 10% (v/v) acetic acid.

5.2.7 Antibacterial activity

Antibacterial activity of LF20-40 was evaluated on Gram-positive (*Staphylococcus aureus* ATCC-6538) and Gram-negative (*Escherichia coli* ATCC-25922, *Klebsiella pneumoniae* ATCC-29665) bacteria. Bacterial strains were provided by *Departamento de Antibióticos, Universidade Federal de Pernambuco*, Brazil. Stationary cultures were maintained on Nutrient Agar (NA) and stored at 4 °C.

Bacteria were cultured in Nutrient Broth (NB) and incubated at 37 °C for 3 h. The culture concentrations were adjusted turbidimetrically at a wavelength of 600 nm to 10^5 - 10^6

colony forming units (CFU)/ml. The minimal inhibitory concentration (MIC) was determined. A 1/1000 dilution in NB of a 10^5 - 10^6 CFU overnight culture was prepared. LF20-40 (20 μ L containing 12.24 mg/ml of protein) was diluted 1:2 in NB and diluted further in a series of 10 double dilutions, to a final ratio of 1:2048. A 180 μ l aliquot of each dilution was dispensed into each well of a microtiter plate. All the wells were inoculated with 20 μ l of the 1/1000 bacterial inoculum and incubated at 37 °C for 24 h. Assays for each concentration were made in triplicate. After incubation, the optical density at 490 nm (OD₄₉₀) was measured using a microplate reader. MIC was determined as the lowest concentration at which there was $\geq 50\%$ reduction in optical density relative to the control well OD₄₉₅ (Amsterdam, 1996).

Minimal bactericide concentration (MBC) was determined from the MIC assay. Aliquots (10 μ l) from each well of the treatments that were found to inhibit bacterial growth were transferred to a petri dish containing NA medium and incubated for 48 h at 28 °C. MBC corresponded to the lowest concentration showing no bacterial growth.

5.3 Results and discussion

The expansion of fish farming has led to a growing concern regarding its environmental impact since at least 20% of the fish production has become waste. Due to the increased interest in environmentally-friendly farming practices and regulation by environmental protection agencies, the aquaculture industry has searched for ways to reduce or reuse the wastes (Arvanitoyannis and Kassaveti, 2008). The environmental imbalance due to the dumping of fish waste into rivers or landfills stimulated us to evaluate preparations from tilapia viscera for presence of trypsin inhibitors, molecules that have showed a broad range of biological activities and biotechnological applications.

Liver, stomach and intestine extracts were treated with ammonium sulphate and the precipitate fractions with different protein concentrations (Table 1) were heating at 80 °C.

Liver, stomach and intestine from *O. niloticus* contains trypsin-like enzymes (Bezerra et al., 2005; Hinsui et al., 2006; Klahan et al., 2009) and the heating here performed aimed to eliminate trypsin activity from tilapia preparations; presence of trypsin prevents the detection of effect of tilapia preparations on the bovine trypsin used in the trypsin inhibitor assay. Thermal treatment is efficient to denature trypsin and this alternative can be used in procedures for trypsin inhibitor detection since that trypsin inhibitors generally are thermo-resistant proteins (Paiva et al., 2006).

Table 1. Characterization of fractions from liver, stomach and intestine of tilapia

Ammonium sulphate fractions	Biochemical parameters			
	Protein (mg/mL)	Protein (mg)	Specific trypsin inhibitor activity (U/mg) ^a	Total trypsin inhibitor activity (U) ^a
Liver				
LF0-20	0.057	3.42	183.1	626.2
LF20-40	0.015	0.105	6,700.9	703.6
LF40-60	0.025	0.125	5,136.8	642.1
L supernatant 60	0.012	1.2	831.1	997.3
Stomach				
SF0-20	0.017	0.17	6,000	1,020
SF20-40	0.107	0.535	561.5	300.4
SF40-60	0.360	2.16	189	408.2
S supernatant 60	0.130	1.3	1,002	1,302.6
Intestine				
IF0-20	1.5	7.5	0	0
IF20-40	0.9	4.5	0	0
IF40-60	0.618	3.7	0	0
I supernatant 60	0.087	0.348	1.05	0.36

^a Determined after heating of liver (L), stomach (S) and intestine (I) precipitated fractions (F) and supernatants at 80 °C for 1 h.

The ammonium sulphate fractions without trypsin-like activity contains trypsin inhibitor since they were able to inhibit the BApNA hydrolysis by bovine trypsin. Highest trypsin inhibitor activity was found for LF20-40 from liver followed by SF0-20 from stomach; I supernant 60 from intestine promoted slight inhibition of bovine trypsin activity (Table 1).

LF20-40 due to highest specific activity (Table 1) was selected for trypsin inhibitor isolation by chromatography on column of immobilized trypsin (Figure 1A). Chromatographic fractions were evaluated for protein concentration and trypsin inhibitor activity (Figure 1B); the determined specific trypsin inhibitor activities of unadsorbed and adsorbed pools were 48 and 950 U/mg, respectively. SDS-PAGE showed that unadsorbed pool contains six polypeptide bands while two polypeptide bands were detected in the adsorbed pool (Figure 1A, insets 1 and 2). These data reveals that the affinity chromatography promoted purification of *O. niloticus* trypsin inhibitor (OnTI).

LF20-40, preparation containing OnTI, was evaluate for antibacterial effect on *S. aureus*, *K. pneumoniae* and *E. coli*, microorganisms that causes several infectious diseases in humans and have developed resistance to antibacterial agents (Sáenz et al., 2001; Kanafani and Fowler Jr., 2006; Dienstmann et al., 2010). Serine protease inhibitors may have a common ancestor with antimicrobial peptides and molecules that contain a trypsin inhibitor loop in their structure constitute potential antibacterial agents (Li et al., 2007).

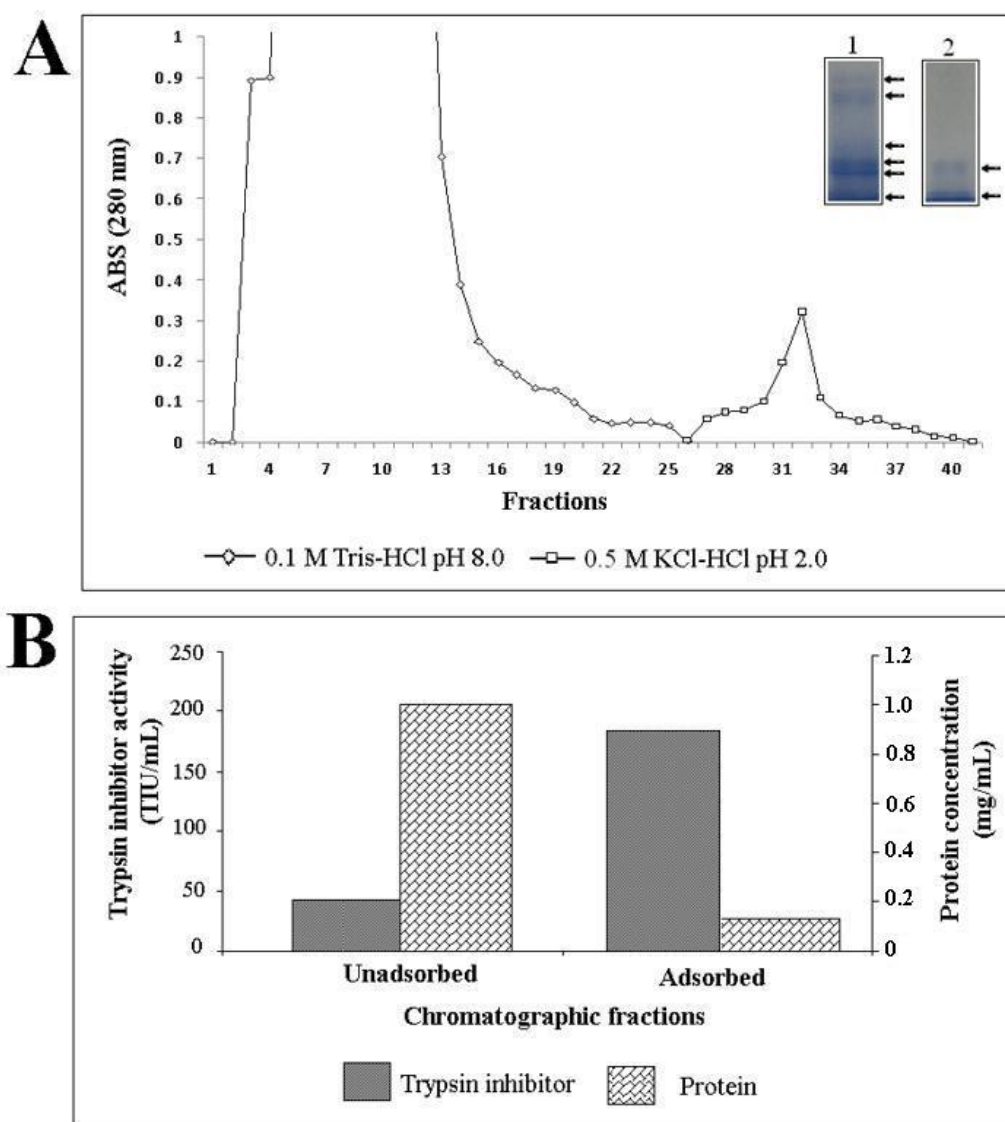


Figure 1. (A) Chromatography of LF20-40 on Trypsin-Agarose column; fractions (1.0 mL) were collected; Insets 1 and 2 show SDS-PAGE of unadsorbed (fractions 3 to 15) and adsorbed (fractions 30-34) pools, respectively. Polypeptides were stained with Coomassie Brilliant Blue. (B) Trypsin inhibitor activity and protein concentration of unadsorbed and adsorbed pools.

Table 2 shows that LF20-40 was more active on Gram-positive bacterium (*S. aureus*) than Gram-negative bacteria (*K. pneumoniae* and *E. coli*). The liver preparation had bacteriostatic effect higher on *S. aureus* than *K. pneumoniae*, did not affect *E. coli* growth and showed bactericidal activity only on *S. aureus*. These effects can be due to bacteria structure that is permeable or not to OnTI; Gram-positive bacteria possess an outer and thick (20-80 nm) layer containing peptidoglycan while Gram-negative bacteria have a thin (5-10 nm) peptidoglycan layer as well as an outer cell wall that functions as an additional barrier to the entry of some antibacterial agents (Trabulsi and Atterthum, 2005).

Table 2. Antibacterial activity from LF20-40.

Bacteria	Antibacterial activity (mg/mL)	
	MIC	MBC
<i>Staphylococcus aureus</i> (+)	0.09	0.76
<i>Klebsiella pneumoniae</i> (-)	1.53	ND
<i>Escherichia coli</i> (-)	ND	ND

(+) Gram-positive bacteria. (-) Gram-negative bacteria. ND: not detected. MIC correspond to the lowest concentration at which there was $\geq 50\%$ reduction in bacteria growth and MBC to the lowest concentration showing no bacterial growth.

Antibacterial activity of serine protease inhibitors isolated from animals has been evaluated. Similarly to LF20-40, the inhibitor of metazoan *Hydra* inhibited *S. aureus* (MIC of 0.7-0.8 μM) but not *E. coli* growth and was suggested that the inhibitor appears to inhibit protease which is essential for growth of *S. aureus* (Augustin et al., 2009). Trypsin inhibitor of frog *Odorrana grahami* was able to kill *S. aureus* and the study revealed that the interface between cell wall and cytoplasmic membrane disappeared probably due to lysis of both or their separation; the cytoplasmic membrane is involved in cell wall synthesis and turnover, affecting cell wall integrity and autolysis mechanisms (Li et al., 2007).

5.4 Conclusion

Liver from *O. niloticus* is source of OnTI, a trypsin inhibitor with bacteriostatic and bactericidal effects against *S. aureus*. To our knowledge there are no reports of trypsin inhibitor from tilapia viscera. This work indicates tilapia liver, by-product from tilapia filleting industry, as source of antibacterial agent. Additionally, the study contributes for health of Environment suggesting potential use for waste discharged into water-bodies and landfills.

Acknowledgments

The authors express their gratitude to the Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) for research grants, fellowship (PMGP and LCBBC) and post-doctoral fellowship (EVMMC). We are also grateful to the Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia do Estado de Pernambuco (FACEPE) and the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) for financial support. We thank Maria Barbosa Reis da Silva for technical assistance.

References

- Amsterdam, D. (1996). Susceptibility testing of antimicrobials in liquid media. In: Loman, V. (Ed.), *Antibiotics in laboratory medicine* (1. ed., 52-111.). Baltimore: Williams and Wilkins.
- Arvanitoyannis, I. S.; Kassaveti, A. (2008). Fish waste management: treatment methods and potential uses of treated waste. In: Arvanitoyannis, I. S. (Ed.), *Waste management for the Food Industries* (1. ed., 861-937). Academic Press.
- Augustin, R.; Siebert, S.; Bosch, T.C.G. (2009). Identification of a kazal-type serine protease inhibitor with potent anti-staphylococcal activity as part of Hydra's innate immune system. *Developmental and Comparative Immunology*, 33, 830-837.
- Bezerra, R.S.; Lins, E.J.F.; Alencar, R.B.; Paiva, P.M.G.; Chaves, M.E.C.; Coelho, L.C.B.B.; Carvalho Jr., L.B. (2005). Alkaline proteinase from intestine of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Process Biochemistry*, 40, 1829-1834.
- Bhattacharyya, A.; Leightin, S.M.; Babu, C.R. (2007). Bioinsecticidal activity of *Archidendron ellipticum* trypsin inhibitor on growth and serine digestive enzymes during larval development of *Spodoptera litura*, *Comparative Biochemistry and Physiology Part C*, 145, 669-677.
- Bradford, M.M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72, 248-254.
- Dienstmann, R.; Picoli, S. U.; Meyer, G.; Schenkel, T. & Steyer, J. (2010). Avaliação fenotípica da enzima *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase (KPC) em *Enterobacteriaceae* de ambiente hospitalar. *Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial*, 46, 23-27.

- Fear, G.; Komarnytsky, S.; Raskin, I. (2007). Protease inhibitors and their peptidomimetic derivatives as potential drugs. *Pharmacology & Therapeutics*, 113, 354-368.
- Green, A. A. & Hughes, W. L. (1955). Protein fractionation on the basis of solubility in aqueous solution of salts and organic solvents. In: Colowick, S.; Kaplan, N. (Eds.), *Methods in Enzymology* (1. ed., 67-90). New York: Academic Press.
- Hinkamp, D. (1996). A taste for waste. Oregon's Agricultural Progress, Oregon State University.
- Hinsui, J.; Worawattanamateekul, W.; Raksakulthai, N.; Runglerdkriangkrai, J. (2006). Characterization of partial purified trypsin and chymotrypsin from viscera of Nile Tilapia (*Oreochromis niloticus* Linneaus). *Kasetsart J. (Nat. Sci.)*, 40, 242-248.
- Joseph, S. M.; Nair, J. R.; George, M. C.; Pillai, D.; Sherief, P. M. (2006). Antiatherogenic activity of cuttlefish liver oil in rats fed high fat diet. *Annals of the 7th Asia Pacific Marine Biotechnology Conference, Session VI. National Institute of Oceanography, India*.
- Kanafani, Z.A.; Fowler Jr., V.G. (2006). *Staphylococcus aureus* infections: new challenges from an old pathogen. *Enfermedades infecciosas y microbiología clínica* 24, 182-193.
- Kim, J.; Park, S.; Hwang, I.; Cheong, H.; Nah, J.; Hahm, K.; Park, Y. (2009). Protease inhibitors from plants with antimicrobial activity. *International Journal of Molecular Sciences*, 10, 2860-2872.
- Klahan, R.; Areechon, N.; Yoonpundh, R.; Engkagul, A. (2009). Characterization and activity of digestive enzymes in different sizes of nile tilapia (*Oreochromis niloticus* L.). *Kasetsart J. (Nat. Sci.)*, 43, 143 – 153.
- Koblinski, J.E.; Ahram, M.; Sloane, B.F. (2000). Unraveling the role of proteases in cancer. *Clinica Chimica Acta*, 291, 113-135.

- Laemmli, U.K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4, *Nature*, 227, 680-685.
- Li, J.; Zhang, C.; Xu, X.; Wang, J.; Yu, H.; Lai, R.; Gong, W. (2007). Trypsin inhibitory loop is an excellent lead structure to design serine protease inhibitors and antimicrobial peptides. *The FASEB Journal*, 21, 2466-2473.
- Nyingi, D.; De Vos, L.; Aman, R.; Agnès, J. (2009). Genetic characterization of an unknown and endangered native population of the Nile tilapia *Oreochromis niloticus* (Linnaeus, 1758) (Cichlidae; Teleostei) in the Lobo Swamp (Kenya). *Aquaculture*, 297, 57-63.
- Oetterer, M. (2003) *Industrialização do pescado cultivado*. 1st ed. Guaíba: Editora Agropecuária.
- Popma, T.; Lovshin, L. (1995). Aspectos relevantes da biologia e do cultivo das tilápias. *Panorama da Aqüicultura*, 27, 8-13.
- Ramos, V.S.; Freire, M.G.M.; Parra, J.R.P.; Macedo, M.L.R. (2009). Regulatory effects of an inhibitor from *Plathymenia foliolosa* seeds on the larval development of *Anagasta kuehniella* (Lepidoptera). *Comparative Biochemistry and Physiology Part. A*, 152, 255-261.
- Rosa, M.J.S. (2009). *Aproveitamento integral dos resíduos da filetagem de tilápia e avaliação do impacto econômico*. Jaboticabal: Centro de Aqüicultura, Universidade Estadual Paulista.
- Sherief, P. M.; Pillai, D.; Nair, J. R.; George, M. C.; Joseph, S. M.; Senan, V. P. (2006). Bioactive substances from squid and Cuttlefish processing waste. *Annals of the 7th Asia Pacific Marine Biotechnology Conference, Session VI*. National Institute of Oceanography, India.

- Stevanato, F. B.; Almeida, N. E.; Matsushita, M.; Oliveira, C. C.; Souza, N. E.; Visentainer, J. V. (2008). Fatty acids and nutrients in the flour made from tilapia (*Oreochromis niloticus*) heads. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, 28, 440-443.
- Trabulsi, L.R.; Atterthum, F. *Microbiologia*. 4. ed. São Paulo: Atheneu, 2005.
- Tsadik, G. G.; Bart, A. N. (2007). Effects of feeding, stocking density and water-flow rate on fecundity, spawning frequency and egg quality of Nile tilapia, *Oreochromis niloticus* (L.). *Aquaculture*, 272, 380-388.
- Wisniewski Jr., A.; Wiggers, V.R.; Simionatto, E.L.; Meier, H.F.; Barros, A.A.C.; Madureira, L.A.S. (2010). Biofuels from waste fish oil pyrolysis: Chemical composition. *Fuel*, 89, 563-568.

6. CONCLUSÕES

Fígado de *O. niloticus* é fonte de inibidor de tripsina (OnTI) com efeitos bacteriostático e bactericida contra *S. aureus*. O trabalho indica o fígado de tilápia, subproduto da indústria de filetagem de tilápias, como fonte de agente antibacteriano. Adicionalmente, o estudo contribui para a saúde do ambiente, sugerindo o uso potencial de resíduos despejados em massas de água e aterros sanitários.