

UFAL

INSTITUTO DE QUÍMICA E BIOTECNOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA E
BIOTECNOLOGIA

PURIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE TRIPSINA A PARTIR DO CECO- PILÓRICO DO
PACAMÃ (*Lophiosilurus alexandri*)

CLÁUDIO WILIAN VICTOR DOS SANTOS

UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALAGOAS

Campus A. C. Simões

Tabuleiro dos Martins

57072-970 - Maceió - AL

CLÁUDIO WILIAN VICTOR DOS SANTOS

**PURIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE TRIPSINA A PARTIR DO CECO-
PILÓRICO DO PACAMÃ (*Lophiosilurus alexandri*)**

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química e Biotecnologia da Universidade Federal de Alagoas, como requisito parcial da obtenção do grau de mestre em Ciências.

Orientador: Prof.º Dr.º Hugo Juarez Viera Pereira

Catálogo na fonte
Universidade Federal de Alagoas
Biblioteca Central
Divisão de Tratamento Técnico
Bibliotecária Responsável: Janaína Xisto

S237p Santos, Cláudio Wilian Victor dos.
Purificação e caracterização de tripsina a partir do seco-pilórico do Pacamã (*Lophosilurus alexandri*) / Cláudio Wilian Victor dos Santos. – 2016.
82 f. : il., grafs., tabs.

Orientador: Hugo Juarez Viera Pereira.
Dissertação (Mestrado em Química e Biotecnologia) – Universidade Federal de Alagoas. Instituto de Química e Biotecnologia. Programa de Pós-Graduação em Química e Biotecnologia. Maceió, 2016.

Bibliografia: f. 71-82.

1. Pacamã (*Lophosilurus alexandri*). 2. Tripsina – Caracterização.
3. Tripsina – Purificação. 4. Piscicultura – Comercialização. I. Título.

CDU: 597



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



BR 104 Km14, Campus A. C. Simões
Cidade Universitária, Tabuleiro dos Martins
57072-970, Maceió-AL, Brasil
Fone/Fax: (82) 3214-1144
email: ppgqb.ufal@gmail.com

FOLHA DE APROVAÇÃO

Membros da comissão julgadora da defesa de dissertação de mestrado de **Claudio Wilian Victor dos Santos**, intitulada: **“Purificação e Caracterização de Tripsina a partir do Ceco-Pilórico do Pacamã (*Luphiosilurus alexandri*)”**, apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química e Biotecnologia da Universidade Federal de Alagoas, em 24 de janeiro de 2016, às 15h, na Sala de Reuniões do PPGQB.

COMISSÃO JULGADORA

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

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

Profa. Dra. Edma Carvalho de Miranda
(IQB/UFAL)

Aos meus familiares, e em homenagem aos meus eternos heróis, meu pai Luiz Wanderley S. Santos, e meu avô, Hermínio Pedro dos Santos. Sem vocês eu não teria alcançado essa vitória!!!

AGRADECIMENTOS

A Deus, pela oportunidade concedida de ingressar no programa de pós graduação, por ter sido um pai supridor nos momentos mais delicados que tive que enfrentar ao longo dessa jornada, e por sua companhia incontestável, pois sem Ele, nada do que foi feito poderia ser concluído.

A minha mãe, Maria Luiza Victor, por toda coragem e companheirismo, onde soube com prudência guiar seus filhos em corretos caminhos. A meu irmão, Luiz Felipe Victor, por seu esforço e empenho a me ajudar com esse trabalho. A minha vó Epifania e demais familiares, pela compreensão nos momentos de ausência.

Ao Professor Orientador Drº Hugo J. V. Pereira, pelo acolhimento em seu grupo de pesquisa, atenção e esclarecimentos de dúvidas no campo de pesquisa.

Aos demais professores do laboratório, especialmente a professora Drº Edma Miranda.

A Maria Elizabeth, por ter sido a profissional responsável em mostrar todos os encantos da Bioquímica. Além da amizade, companheirismo e ensino oferecidos durante os momentos no laboratório.

Ao colega de laboratório Drº Humberto Tenório, que com humildade, atenção, cordialidade, ensino e paciência oferecidos foram de fundamental importância à execução deste trabalho.

A Sarah K. M. Cavalcante, grande amiga, companheira e irmã de longas datas, onde tive a graça de poder contar com a sua ajuda, aconselhamento, e principalmente interseção. Pela credibilidade confiada nos momentos de desabafo.

Aos amigos Cledson Barros, Giovanne, Josiel, Tomás, João Artur, Nicolás, Susana, Tayana, Woodland, Marina, Fabiana, Uriel, Monike, Roberto, Wanessa, Ábner, Talita, Martah enfim, todos que sofreram, riram, choraram e estiveram presentes com ajuda inestimada por toda pesquisa.

A amável Josenilda, por seu acolhimento, cuidado e apreço e ao grande amigo Adriano, por ter nos ajudado com os peixes utilizados na pesquisa.

Ao grande amigo e irmão Ricardo Costa, pessoa incomparável, guerreiro, bom pai, e fiel companheiro de trabalho. Esteve sempre presente nos momentos que mais precisei, dividimos almoços, jantares e principalmente a hospitalidade, onde nos encorajávamos a nunca parar de sonhar em oferecer um futuro mais digno aos nossos familiares.

Aos órgão de fomento CAPES e CNPq pelo apoio financeiro.

RESUMO

A Organização das Nações Unidas para Alimentação e Agricultura (FAO) indica que, até 2030, a população mundial passará de 7,0 bilhões para 8,3 bilhões. Diante desta realidade, a comercialização de peixes é uma atividade que tem aumentado de forma expressiva, especialmente aqueles derivados de aquicultura. O Brasil, por exemplo, é um forte candidato a se tornar o maior produtor e exportador nessa categoria, por causa de sua grande diversidade e condições geoclimáticas. Um dos principais desafios enfrentados pelos criadores é o elevado custo de produção, especialmente na alimentação que, dependendo da espécie, pode chegar a 70% do total das despesas. A fim de compensar os custos excessivos de produção, sugere-se que os criadores disponham de todo o potencial de massa dos animais e não apenas a comercialização da fibra muscular. Os resíduos oriundos desta atividade possuem como característica um potencial biotecnológico bastante significativo, como fonte de enzimas que podem ser aplicadas em vários processamentos industriais. Dentre elas, as proteases são responsáveis hoje por cerca de 50% do total das vendas industriais. Nesse trabalho isolamos a tripsina do pacamã (*Luphiosilurus alexandri*), peixe nativo do Rio São Francisco. A qual foi purificada em apenas dois processos de purificação: precipitação com sulfato de amônio e cromatografia líquida de troca aniônica em DEAE-Sepharose; com recuperações de 86,97 e 44,91%, respectivamente. A massa molecular da tripsina foi estimada em 24 kDa, através de SDS-PAGE, apresentando apenas uma banda quando corada por prata. A enzima purificada mostrou atividades ótimas em 50 °C e pH 9,0, assim como manteve estabilidade até pH 11 e 50 °C, após incubação de 60 minutos. O teste de inibição confirmou inibição total por PMSF, inibidor de serino protease, e ausência de inibição frente EDTA e 2-mercaptoetanol. Por outro lado, as constantes cinéticas, k_m e k_{cat} , para BApNA foram 0,517 e 5,0, respectivamente. A enzima purificada também se mostrou ativa quando imobilizada em uma zimografia com caseína. Por estas razões, considera-se que a tripsina do Pacamã seja uma enzima promissora para os processos industriais, uma vez que, apresenta uma larga faixa de estabilidade em pH e temperatura, bem como a atividade, mesmo para a imobilização em matrizes sólidas.

Palavras-chave: Purificação, Caracterização, Pacamã (*Luphiosilurus alexandri*), Tripsina.

ABSTRACT

The Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO) indicate that until 2030, world population will rise from seven billion to 8.3 billion. Facing this reality, the commercialization of fish is an activity that has been increasing expressively in the production chain, especially those derived from aquiculture, represented by species grown in captivity. Brazil, for example, is a strong candidate to become the major producer and exporter in the category because of its wide diversity and proper geographic and climate conditions. One of the major obstacles faced by breeders is related to production cost, especially food costs that, depending on the species, can reach 70% of total expenses. In order to counterbalance the excessive costs of production, breeders should dispose all of the animals' mass potential and not only the commercialization of muscle fiber since around 30% of the assessed weight corresponds to innards, majorly categorized as sub-products. These residues take on significant biotechnological potential providing, for example, a source of enzymes that can be applied in several industries. In the past few years, searching for proteases from different sources is an activity that has been increasing significantly; around 50% of total industrial sales of enzymes consist of proteases. We highlight the pioneer study of an isolated enzyme from Pacamã (*Luphiosilurus alexandri*), native fish from São Francisco River (Brazil). Trypsin of *Luphiosilurus alexandri* pyloric cecum was purified with only two purification processes: ammonium sulfate precipitation and anion exchange liquid chromatography in DEAE-Sepharose; with a recuperation of 86.97 and 44.91 %, respectively. Trypsin mass was estimated in 24 kDa through SDS-PAGE, presenting only one band when subject to silver coloration. The purified enzyme presented optimum temperature and pH at 50°C, and pH 9.0, respectively, using BApNA as substrate. Stability maintained high levels of activity up to pH 11 as well as high stability up to 50°C after a 60-minute incubation. The inhibition test verified strong inhibition by PMSF, Serine-proteases inhibitor, and absence of inhibition for EDTA and 2-Mercaptoethanol. Kinetic constants k_m and k_{cat} for BApNA were 0.517 and 5.0, respectively. The purified enzyme also proved active in a zymography with casein. For these reasons, we consider it to be a promising enzyme for industrial processes for presenting a wide range of stability in pH and temperature as well as activity even for immobilization in solid matrices.

Keywords: Purification, Characterization, Pacamã (*Luphiosilurus alexandri*), Trypsin.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Consumo de Proteína Animal -----	18
Figura 2: Consumo de Proteína Animal -----	19
Figura 3: Lophiosiluros alexandri -----	22
Figura 4: Perfil de distribuição das Proteases -----	29
Figura 5: Subdivisão das Serinoproteases Digestivas -----	33
Figura 6: Mecanismo de Hidrólise de Serinoproteases -----	34
Figura 7: Estrutura Tridimensional da β -tripsina Pancreática Bovina -----	36
Figura 8: Variáveis Utilizadas no Processo de Purificação de Proteínas -----	43
Figura 9: CODEVASF (Porto Real do Colégio/ AL; Petrolina/PE) -----	46
Figura 10: Hidrólise do N-a-benzoyl-L-arginine-p-nitroanilide (BApNA)-----	47
Figura 11: Atividade de Precipitação -----	53
Figura 12: Cromatograma (DEAE-Sepharose)-----	54
Figura 13: Eletroforese SDS-PAGE (12%) -----	56
Figura 14: SDS-PAGE (15%) de Enzima Purificada -----	58
Figura 15: Eletroforese Nativa e Enzimograma -----	60

Figura 16: pH Ótimo -----	62
Figura 17: Estabilidade em pH -----	63
Figura 18: Temperatura Ótima -----	64
Figura 19: Estabilidade Térmica -----	65
Figura 20: Teste de inibição -----	66
Figura 21: Fenilmetilsulfonil (PMSF) -----	66
Figura 22: Gráfico Michaelis-Meten (Km) -----	67

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Classificação Internacional das Enzimas -----	26
Tabela 2: Precipitação Salina -----	47
Tabela 3: Frações de Precipitação A410 -----	52
Tabela 4: Resumo de purificação da Tripsina a partir do Pacamã -----	60
Tabela 5: Constantes Cinéticas -----	69

LISTA DE ABREVIATURAS, SÍGLAS E SÍMBOLOS

Ala	Alanina
Arg	Arginina
BApNA	Hidrólise do N-a-benzoyl-L-arginine-p-nitroanilide
DMSO	Dimetilsufóxido
[E]	Enzima Total
EDTA	Ácido Etilenodiaminotetracético
FAO	Food and Agriculture Organization of the United Nations
g	Grama
Gly	Glicina
h	Horas
HCl	Ácido Clorídrico
Kcat	Número de turnover
K	Lisina
Kg	Quilograma
<i>K_m</i>	Constante de Michaelis–Menten
Lys	Lisina
M	Molaridade
mg/mL	Miligrama por Mililitro
ml	Mililitros
min	Minutos
m/m	Razão massa massa
MPA	Ministério da Pesca e Aquicultura
NaCl	Cloreto de sódio V _{max} : Velocidade Máxima
(NH₄)₂SO₄	Sulfato de Amônio
OMS	Organização Mundial de Saúde
PB	Peptídeos bioativos
pH	Potencial hidrogênioônico
Phe	Fenilalanina
PIB	Produto Interno Bruto
PMSF	Fluoreto de Fenilmetilsulfonil
R	Arginina
RNA	Ácido Ribonucleico

SDS	Dodecil Sulfato de Sódio
SDS-PAGE	Eletroforese em gel de poliacrilamida com dodecil sulfato de sódio
Sebrae	Serviço de Apoio às Micro e pequenas Empresas
T	Temperatura (°C)
t	Tempo (min)
TE	Tampão de Extração
TEMED	Tetrametiletilenodiamina
TRIS	Tris-(hidroximetil)-aminometano
Trp	Triptofano
Tyr	Tirosina
U/mL	Unidade de atividade por Mililitro
Vmax	Velocidade máxima da reação

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	16
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	18
2.1	Aquicultura, Aspectos Socioeconômicos	18
2.2	Piscicultura Brasileira	19
2.3	Pacamã (<i>Lophiosilurus alexandri</i>)	21
2.4	Desafios Encontrados	22
2.5	Aspectos Enzimáticos na Digestão dos Peixes	24
2.6	Proteases	26
2.6.1	Aplicações biotecnológicas	28
2.6.1.1	Proteases na indústria de detergentes	29
2.6.1.2	Proteases na indústria alimentícia	31
2.6.2	Tripsina	33
2.7	Purificação de Proteínas	39
3	OBJETIVOS	45
3.1	Objetivo Geral	45
3.2	Objetivos Específicos	45
4	METODOLOGIA	46
4.1	Obtenção das Vísceras	46
4.2	Preparo do Extrato Bruto	46
4.3	Precipitação com Sulfato de Amônio	47
4.4	Cromatografia Líquida	48
4.5	Calculo de Unidades Enzimáticas	48
4.6	SDS-PAGE/ Eletroforese Nativa e Zimograma	48
4.7	Determinação da Concentração de Proteína	49
4.8	Teste de pH Ótimo e Estabilidade	49
4.9	Teste de Temperatura Ótima e Estabilidade Térmica	50
4.10	Teste de Inibição	50
4.11	Estudos Cinéticos	51
5	RESULTADOS E DISCUSSÕES	52

5.1	Precipitação Salina -----	52
5.2	Cromatografia (DEAE- Sepharose) -----	54
5.3	Eletroforese SDS-PAGE -----	55
5.4	Eletroforese Nativa e Zimograma -----	59
5.5	Caracterização Enzimática -----	61
5.5.1	Efeito de pH -----	61
5.5.2	Efeito da temperatura -----	63
5.5.3	Efeito dos inibidores -----	65
5.5.4	Propriedades cinéticas -----	67
6	CONCLUSÃO -----	70
	REFERÊNCIAS -----	71

1 INTRODUÇÃO

Estudos levantados pela Organização das Nações Unidas para Alimentação e Agricultura (FAO) mostram que até o ano de 2030, a população mundial aumentará dos sete bilhões em 2011, para 8,3 bilhões e com maior adensamento populacional nos países asiáticos e africanos (SIDONIO et al., 2012). Com bases nessas estimativas, percebe-se a necessidade de se efetuar adequações em larga escala na produção de alimentos, visto que suprir todo esse contingente representará um enorme desafio a cada país.

Diante dessa realidade, uma atividade que vem ganhando expressivo espaço na cadeia produtiva é a comercialização de pescados, principalmente aqueles provenientes da aquicultura, representada pelas espécies cultivadas em cativeiros. O Brasil por exemplo, se mostra como forte candidato em se tornar o maior produtor e exportador de produtos deste setor. Sua preferência é decorrente da disponibilidade de grandes extensões de terra passíveis de serem destinadas ao cultivo; a boa adaptabilidade das espécies destinadas à criação; e a abundância de água doce e limpa (OLIVEIRA, 2009). Além dos benefícios econômicos assegurados aos produtores aquícolas, outro ponto que merece destaque é a possibilidade de se disseminar espécies nativas com reais riscos de extinção (SEABRA, 2010). Neste trabalho, por exemplo, utilizou-se o Pacamã (*Lophiosilurus alexandri*), peixe nativo do Rio São Francisco, que por excessivos represamentos do rio, teve sua população gradativamente reduzida.

O Pacamã é um Bagre carnívoro, da família Pseudopimelodidae, pertencente a ordem Siluriforme, assim como o Surubim (*Pseudoplatistoma fasciatum*) e o Pintado (*P. corruscans*) (SEABRA, 2010). Seu hábito alimentar é carnívoro, apresenta comportamento sedentário, preferência por ambientes lânticos em regiões de fundo de areia ou de pedras (TRAVASSOS, 1959). O Pacamã é bastante valorizado por seus aspectos organolépticos, como carne saborosa e ausência de espinhos em seu interior muscular, o que lhe confere elevado valor comercial (SANTOS, 2011).

Um dos maiores entraves enfrentados pelos criadores está relacionado com o custo da produção, principalmente dos gastos destinados à alimentação, que dependendo da espécie, pode atingir até 70% (SIDONIO et al, 2012). Para compensar os gastos excessivos durante a produção, aconselha-se dispor de todo o

potencial em massa do animal, e não se ater a comercialização da fibra muscular, visto que aproximadamente 30% do peso referido ao animal corresponde as vísceras, os quais são na maior parte dos casos, categorizados como subprodutos (FAO-SOFIA, 2004 *apud* KHALED et al., 2011). Estes resíduos, por sua vez, assumem forte potencial biotecnológico, como fonte de enzimas, aplicadas no processamento de alimentos, detergentes, e muitos outros produtos (KHANGEMBAM, 2015). Dentre elas, destaca-se a Tripsina (EC 3.4.21.4), serinoprotease responsável pela hidrólise de ligações peptídicas nas extremidades carboxiterminais de resíduos de Lisina (K) e Arginina (R). Normalmente, tripsinas isoladas de peixes, sejam eles de água doce ou salgada, assumem bons níveis de reatividade em condições extremas, a exemplo de alta alcalinidade e temperatura, bem como em presença de agentes surfactantes (KHANGEMBAM, 2015).

Assim, trabalhos voltados a purificação e caracterização destas moléculas passaram a ser alvo de muitas pesquisas, tendo sempre como meta a ser alcançada, metodologias de baixo custo, e com elevado nível de recuperação, sendo umas das fontes biológicas mais utilizadas as vísceras dos peixes: *Pseudupeneus maculatus* (SOUZA et al., 2007), *Lutjanus vitta* (KHANTAPHANT e BENJAKUL, 2010), *Sardinella aurita* (KHALED et al., 2011), *Diapterus rhombeus* (SILVA et al., 2011) e *Salaria basilisca* (KTARI et al., 2012).

Diante destas abordagens, objetivou-se por meio do presente trabalho, purificar e caracterizar a tripsina do ceco-pilórico do Pacamã (*Lophiosilurus alexandri*), espécie nativa da região do baixo São Francisco.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Aquicultura, Aspectos Socioeconômicos

O setor agropecuário participa na atualidade como o principal fornecedor de produtos alimentícios, sob a responsabilidade de distribuir no mercado econômico produtos consumidos de forma direta, sem prévio processamento industrial, mas também aqueles classificados como industrializados. Sob perspectivas gerais, por traz de toda a rede econômica envolvida nas transações de importação e exportação dos produtos, há uma preocupação quanto à qualidade e confiabilidade dos diferentes alimentos comercializados, assim como, se houver um aumento populacional, se este setor conseguirá suprir e manter a demanda alimentar de forma a garantir a qualidade dos mesmos.

Vale ainda ressaltar que além do fator demográfico em expansão, outro ponto que reflete de forma direta no consumo de alimentos é o aumento da renda. De acordo com Roppa (2009), o consumo de carne tem uma forte correlação com o PIB *per capita*, ao passo que se eleva o poder aquisitivo, aumenta-se também o consumo de carnes, e em decorrência, a sua produção. Ao traçar um perfil para ingestão de proteína animal em suas diferentes categorias, ver-se que em escala global, as proteínas provenientes de pescados e suínos são as que mostram maior taxa de consumo (**Figura 1**).

Figura 1: Consumo Mundial de Proteínas Animal.

	Produção (mil ton)	Exportação** (mil ton)	Consumo (mil ton)
Pescados*	145.100	32.348	116.960
Suínos	100.399	12.066	100.268
Aves	72.293	10.733	71.860
Bovinos	57.027	9.607	56.116
Caprinos e ovinos	13.236	1.007	13.139

Fonte: Sidonio et al., 2012.

Ao observar a figura acima, no ano de 2009 o consumo de pescados chegou a ordem de 116.960 mil toneladas, que para FAO (2010), atinge um valor superior a 17 kg por habitante, ficando acima do consumo mínimo especificado pela Organização Mundial de Saúde (OMS), 12 kg por habitante ao ano (MPA, 2015). Realizando essa mesma análise na **Figura 2**, observa-se uma inversão para o

cenário nacional, de forma que as carnes provindas de pescados ocupam apenas a quarta posição no ranking aferido para o mesmo ano.

Figura 2: Consumo Nacional de Proteínas Animal.

	Produção (mil ton)	Exportação (mil ton)	Consumo (mil ton)
Aves	11.023	3.265,000	8.023
Bovinos	9.180	1.422,000	7.410
Suínos	3.130	643,000	2.423
Pescados*	1.241	30,000	1.723
Caprinos e ovinos	110	0,048	117

Fonte: Sidonio et al., 2012.

O valor nutricional do pescado e a divulgação de estudos que o associam com melhorias para a saúde têm causado, nos últimos anos, um forte aumento no interesse por esse alimento (SARTORI; AMANCIO, 2012). Para determinados países isso representa uma boa oportunidade de alavancar e diversificar a sua economia, desde que possua, é claro, capacidade hídrica para ser explorada.

2.2 Piscicultura Brasileira

Dados divulgados pelo MPA (2015) afirmam que o Brasil, apresenta uma costa marítima de 8,5 mil quilômetros, aproximadamente 12% de toda água doce do planeta, e cerca de 8,2 bilhões de metros cúbicos de água distribuídos entre rios, açudes, lagos e represas. Isso mostra as excelentes condições que propiciam o país em se tornar o maior produtor de pescados, ao ponto de sua produção atingir a ordem de vinte milhões de toneladas anuais, possibilitando desta forma, o abastecimento interno, assim como assegurar uma oferta crescente para os demais países, dos quais se destacam os EUA, maior comprador de pescados da atualidade (SIDONIO et al., 2012). Antes de entrar nestas discussões e trazer à tona novas temáticas, é preciso entender que há uma diferença entre o conceito de pesca e aquicultura. Segundo o Serviço de Apoio às Micro e Pequenas Empresas (SEBRAE, 2011), pesca é a retirada de organismos aquáticos da natureza sem prévio cultivo. Trata-se de uma atividade que pode ser operacionalizada em diferentes ambientes, desde regiões marítimas a espaços continentais. Por outro lado, a aquicultura é conceituada como uma atividade multidisciplinar, representada pelo cultivo de

diferentes organismos aquáticos (plantas aquáticas, moluscos, crustáceos e peixes). Além disso, é necessário que haja a intervenção ou manejo do processo de criação, com a finalidade de aumento na produção. Assim, pode-se dizer que a mais importante diferença em relação ao conceito da pesca, é que a aquicultura arremete a ideia de exploração de recursos feitos em confinamento (OLIVEIRA, 2009).

Contraopondo os entraves atribuídos à atividade pesqueira, como períodos de desova, sazonalidade das espécies, e níveis de população, verificam-se no Brasil, e de forma semelhante em outros países, um crescimento bem mais acelerado da aquicultura do que a produção pesqueira. Segundo o Ministério da Educação (2006) a taxa nacional superou a média de 30%, valor superior à média mundial de 10%. No Brasil, o aumento da produção desta modalidade está atrelado ao desenvolvimento do setor, que por sua vez, se deu pela ampliação de políticas públicas (BRASIL, 2010), como incentivos por meio de financiamentos, programas de capacitação, bem como o acesso aos programas governamentais existentes. O mais conhecido é o Plano Mais Pesca e Aquicultura desenvolvido pelo MPA. Outra particularidade favorável a prática desta atividade no país é o fator climático, que por ser bastante variado, proporciona uma maior diversidade de espécies cultivadas, favorecendo uma distribuição ordenada entre as diferentes regiões: No Norte prevalecem o Tambaqui (*Colossoma macropomum*) e o Pirarucu (*Arapaima gigas*); no Nordeste a Tilápia (*Oreochromis niloticus*) e o Camarão Marinho (*Litopenaeus vannamei*); no Sudeste a Tilápia; e no Sul prevalecem as Carpas (*Cyprinus carpio*), Tilápias, Ostras (*Ostreidae*) e Mexilhões (*Mytilus edulis*). (SILVA, 2012).

É importante salientar que por mais heterogênea que seja a fauna em sua malha hidrográfica, a criação de peixes no país se deu inicialmente com a implantação de espécies exóticas, a exemplo da Tilápia-do-Nilo e Carpas (ZANIBONI e LUZ, 2001; BORGHETTI et al., 2003; FERNANDES et al., 2003). Apenas em meados dos anos 90, a aquicultura como atividade industrial começou a ganhar importância no Brasil (SEABRA, 2010), e só então na década de 70, foi que se iniciou a implementação de espécies nativas (CYRINO et al., 1996). Algumas regiões, por não haver o controle adequado no processo de criação, sofreram impactos ecológicos com a disseminação de espécies atípicas da região, de sorte que havendo a concorrência territorial, parte delas se sobressaíram, ocasionando assim, a redução, e em casos extremos, a extinção das espécies nativas (SOUZA, 2010). Diante dessa realidade, muitos pesquisadores e produtores já visam à

utilização de espécies próprias do país como prioridade, por ser mais segura e oferecer menor fator de risco ao ecossistema local (SOUZA, 2010).

O crescimento exponencial metropolitano, bem como a agricultura intensiva, exigem como suporte, elevado fornecimento hídrico, e em alguns casos, faz-se necessário a intervenção humana em fontes hídricas, de modo a suprir a demanda, e ao mesmo tempo, garantir a produtividade almejada.

Quando essa intervenção se dá por meio de estudos aprofundados, e com a preocupação de se evitar a agressão ao ecossistema, alcança-se o equilíbrio exigido, permitindo a continuidade do desenvolvimento do país, assim como asseguram a fauna e flora local, condições ótimas de sua permanência. Por outro lado, quando a intervenção humana visa como prioridade exclusiva à manutenção do desenvolvimento econômico, sem levar em consideração os impactos provocados, traz como reflexo uma série de desequilíbrios ambientais, principalmente aqueles relacionados à extinção de espécies nativas da região.

É possível citar como exemplo o Rio São Francisco, onde foi comprovado que após sucessivos represamentos ao longo do mesmo, espécies migratórias como o Surubim (*Pseudoplatystoma coruscans*), o Pirá (*Conorhynchus conirostris*), o Dourado (*Salminus brasiliensis*), a Matrinchã (*Brycon lundii*) e principalmente o Pacamã (*Lophiosilurus alexandri*), espécie de desova parcelada, tiveram seus níveis populacionais decrescidos (TENÓRIO, 2003).

2.3 Pacamã (*Lophiosilurus alexandri*)

O rio São Francisco apresenta 640.000 km² de área, e uma extensão de 2.700 km, equivalente a 8% do território nacional (SEABRA, 2010) é berçário de espécies aquáticas de grande representatividade econômica. Entre as espécies encontradas no rio São Francisco, destaca-se o Pacamã (*L. alexandri*), um bagre carnívoro, da família Pseudopimelodidae, pertencente a ordem Siluriforme, assim como o Surubim (*Pseudoplatystoma fasciatum*) e o Pintado (*P. coruscans*) (SEABRA, 2010).

O pacamã (**Figura 3**) possui cabeça achatada, sua mandíbula ultrapassa a maxila superior, e seus dentes da mandíbula ficam fora da boca quando fechada (BRITSKI et al.,1996).

Figura 3: *Lophiosiluros alexandri*



Fonte: elaborada pelo autor, 2016.

Seu hábito alimentar é carnívoro, apresenta comportamento sedentário, preferência por ambientes lânticos em regiões de fundo de areia ou de pedras (TRAVASSOS, 1959). A sua desova ocorre de forma parcelada, liberando os ovos no substrato arenoso. Geralmente apresenta cuidado parental para com seus ovos e larvas, e são considerados grandes, quando comparados a outras espécies (SATO et al., 2003). Tal peixe é bastante valorizado por seus aspectos organolépticos, como carne saborosa, e a ausência de espinhos intramusculares, o que lhe confere elevado valor agregado pela culinária internacional (SANTOS, 2011).

Assim como outras espécies do rio São Francisco, o *L. alexandri*, vem sendo vítima de ações mal planejadas do homem, de modo que na atualidade, é classificado como um animal em processo de extinção em locais de ocorrência natural (SANTOS, 2011). Neste sentido, a disseminação e incentivo em cultivar essa espécie em cativeiro se mostra de grande valia, pois além de assegurar a permanência da mesma, possibilita aos produtores locais, diversificar a sua produção com espécies próprias da região.

2.4 Desafios Encontrados

Dependendo do peixe que se esteja cultivando, a prática da piscicultura pode ser enquadrada como uma atividade de custos bem elevados, principalmente dos encargos destinados a alimentação, que pode atingir até 70% do total gasto (SIDONIO et al, 2012). Os peixes possuem extensa variedade de hábitos alimentares: podem ser herbívoros, alimentados exclusivamente por plantas, carnívoros, que se alimentam de carnes, e os omnívoros, que se alimentam de animais e vegetais vivos (BALDISSEROTTO, 2002). Além dessa divisão, os peixes

cuja alimentação está centrada à base de plânctons, são ditos seres planctófagos, os que se alimentam de detritos e materiais em decomposição, detriófagos, e aqueles que se alimentam de lama, são conhecidos como lliófagos. Diferentemente da primeira classificação, nada impede que seres planctófagos se alimentem de detritos, ou vice-versa. Na realidade, esse tipo de comportamento é bastante comum para esses animais, é o que se chama de superposição de hábitos alimentares (BALDISSEROTTO, 2002).

Outra característica é que durante a evolução, algumas espécies modificam a sua alimentação. Quando alevinos, podem se alimentar de zooplânctons, por exemplo, e na fase adulta, se alimentarem preferencialmente de plantas (ROTA, 2003). Sobre isso, não há uma ordem predefinida, se trata de particularidades desenvolvidas à cada espécie. Desta forma, é de fundamental importância que os piscicultores conheçam com exatidão a fisiologia dos animais criados, pois uma ração preparada para um animal com hábito alimentar herbívoro (por exemplo), dificilmente obterá bons resultados se utilizados em peixes de hábitos alimentares diferentes. Assim, o uso de rações devidamente balanceadas e de boa qualidade é, de certa forma, fundamental para o alcance de altas taxas na produtividade, bem como elevação na taxa de conversão alimentar.

As espécies mais baratas no mercado, muitas vezes possuem ciclo curto de produção, o que requer baixo investimento, e assim, pouco capital investido (SILVA, 2012). A Tilápia–do-Nilo por exemplo, tem um ciclo produtivo extremamente rápido, seis meses aproximadamente, quando comparado a outros animais, em que esses atingem a fase adulta e alcançando o peso adequado para abate a partir de um ano, e em alguns casos, até mais. Na intenção de compensar os gastos excessivos durante a produção, aconselha-se dispor de todo o potencial em massa do animal (carne, vísceras e outros), e não se ater com exclusividade, a comercialização da fibra muscular, pois cerca de 30% do peso aferido ao peixe corresponde as vísceras e escamas, que são na maior parte dos casos categorizados como subprodutos (FAO-SOFIA, 2004 *apud* KHALED et al, 2011).

Sobre as vísceras, estudos mostram forte potencial biotecnológico destas, por serem fontes de enzimas digestivas de interesse comercial, como para a Indústria alimentícia, farmacêutica, produção de detergentes e muitos outros (KHANGEMBAM, 2015). Desta forma, muitos foram os trabalhos desenvolvidos nos últimos anos, tendo em vista a possibilidade de se isolar e purificar enzimas a partir

de vísceras de espécies aquáticas, as quais pudessem ser viabilizadas em escalas industriais. A exemplo, citam-se: *Sepia officinalis* (BALTI et al., 2009), *Siniperca chuatsi* (LU et al., 2008), *Oncorhynchus masou* (KANNO et al., 2010), *Colossoma macropomum* (BEZERRA et al., 2001; MARCUSCHI et al., 2010), *Oncorhynchus tshawytscha* (KURTOVIC, MARSHALL e SIMPSON, 2006), *Thunnus albacores* (KLOMKLAO et al., 2006), *Sardinops sagax caerulea* (CASTILLO-YANEZ et al., 2005), além de outros.

Uma das principais proteases digestivas detectadas no ceco pilórico e intestino de peixes é a Tripsina (EC 3.4.21.4), que além do seu importante papel em catalisar a hidrólise de proteínas, é responsável também pela ativação de enzimas pancreáticas, sendo que entre as características físico-químicas mais relevantes da tripsina destacam-se: a estabilidade frente a temperaturas moderadamente elevadas, pH moderadamente alcalinos, bem como em presença de agentes surfactantes (SILA et al., 2012). Não obstante, estudos destinados a purificação e caracterização de enzimas a partir de subprodutos da atividade aquícola, se mostram como importantes ferramentas de fortalecimento do setor, uma vez que, descentralizam as linhas de comércio, bem como favorecem a maximização dos lucros por meio do reaproveitamento dos subprodutos antes inutilizados, e quando utilizados, convertidos em materiais de baixo valor econômico.

2.5 Aspectos Enzimáticos na Digestão dos Peixes

Assim como qualquer espécie de seres vivos, os peixes necessitam de nutrientes básicos, os quais fomentem energia e metabólitos essenciais às vias catabólicas e anabólicas. A capacidade digestiva pode ser definida como a habilidade do animal em secretar enzimas no trato digestivo, a fim de hidrolisar as macromoléculas presentes nos alimentos até suas respectivas unidades monoméricas. Os nutrientes dos alimentos, antes de serem absorvidos, devem passar por processos de digestão e absorção. Tais processos dependerão da disponibilidade de enzimas, como a tripsina, quimotripsina e pepsinogênio, as quais podem ser encontradas em locais específicos ao longo do trato gastrintestinal (CHONG et al., 2002; JUN-SHENG et al., 2006; KUMAR et al., 2007).

Para que haja um efetivo processo de digestão, deve ocorrer uma cooperação entre as enzimas digestivas, com os mecanismos físicos de órgãos

como a cavidade bucal, esôfago, estômago (quando existente), intestino, além de outros. O tubo digestivo pode ser subdividido em cavidade bucal ou bucofaringeana, intestino anterior (esôfago e estômago), intestino médio (intestino propriamente dito) e intestino posterior (reto) (ROTTA, 2003). Os vários tecidos e órgãos relacionados a ele estão envolvidos com a apreensão, mastigação e deglutição, seguidas da digestão e absorção dos nutrientes, como também a excreção. Sobre as enzimas, verifica-se que a distribuição e intensidade da atividade variam muito com o hábito alimentar e morfologia dos órgãos que as secretam (HOFER e SCHIEMER, 1981, SABAPATHY e TEO, 1993; TENGJAROENKUL et al., 2000).

Sabendo que os peixes são classificados como carnívoros, herbívoros e onívoros, a depender do ambiente que estejam inseridos, e principalmente da natureza do alimento disponibilizado, estes animais podem naturalmente sofrer readaptação alimentar, a qual influenciará de forma direta na quantidade e tipo de enzimas produzidas. Assim, o valor nutricional de uma dieta não só depende de um balanço adequado entre nutrientes como também a capacidade digestiva do peixe, associada a atividade de enzimas do trato gastrintestinal (EUSEBIO e COLOSO, 2002).

Da mesma forma que a fonte de alimento pode induzir comportamentos moleculares diferenciados, o mesmo ocorre para a morfologia dos tecidos, que são altamente adaptáveis e modificáveis, ao menos em termos evolutivos. O estômago, cuja dimensão correlaciona-se ao tamanho das partículas ingeridas, e frequência da alimentação, assume o papel inicial na desconstrução macromolecular dos alimentos, onde se detecta como principais substâncias secretadas o pepsinogênio e o ácido clorídrico (HCl), que agem na hidrólise inicial de proteínas e mantém o pH do meio em condições ácidas, respectivamente (ROTTA 2003). De acordo com Baldisseroto (2002), o intestino é um tubo relativamente simples, que possui glândulas digestivas e um suprimento abundante de vasos sanguíneos e linfáticos. É nele onde se completa a digestão iniciada no estômago.

Há uma ampla variedade de estruturas associadas ao intestino. Uma das mais importantes são os cecos pilóricos, que são divertículos cegos de formato digitiforme que se encontram na região pilórica e na porção anterior do intestino médio, estando livres entre si ou fundidos à parede do estômago. Espécies onívoras e herbívoras, comparadas com carnívoras, possuem um maior trato digestivo, o que permite que o alimento passe menos tempo em contato com o baixo nível de

proteases (HOFER e SCHIEMER, 1981). Essa característica fisiológica associada com a ampla distribuição das enzimas aumenta em grandes quantidades absorção dos diferentes componentes nutricionais existentes na dieta (TENGJAROENKUL et al., 2000). Sob perspectivas gerais, a digestão de proteínas envolve a ação de diferentes moléculas hidrolíticas, com ações específicas ao longo da cadeia polipeptídica. No caso dos peixes, destacam-se pepsina, tripsina e quimotripsina as quais apresentam ação intestinal. Estas assumem elevada relevância catalítica, disponibilizando ao fim do processo, oligopeptídeos e peptídeos passíveis de serem absorvidos pela mucosa intestinal dos peixes e redistribuídos pelos demais órgãos.

2.6 Proteases

Os seres vivos têm como característica em comum, ainda que sendo de diferentes reinos, o processamento de reações bioquímicas intermediadas por enzimas catalíticas, de forma que sem elas, não seria possível a manutenção da vida (COX, DOUDNA e O'DONNELL, 2012). Existem na atualidade uma infinita gama de enzimas catalogadas, as quais se distinguem quanto a sua função, tamanho, e estabilidade química (**Tabela 1**). Estas por sua vez, alcançam como ponto de convergência a sequência fundamental de resíduos de aminoácidos correspondentes, que a depender da cadeia lateral, poderão ser quimicamente enquadrados como aminoácidos aromáticos (Fenilalanina, Tirosina, Triptofano), aminoácidos alifáticos (Glicina, Alanina, Prolina, Valina, Leucina, Isoleucina, Metionina) (HARVEY e FERRIER, 2012), aminoácidos carregados positivamente (Lisina, Arginina, Histidina), aminoácidos carregados negativamente (Aspartato, Glutamato) e aminoácidos não carregados (Serina, Treonina, Cisteína, Asparagina, Glutamina) (CAMPBELL, 2003).

Tabela 1: Classificação Internacional das Enzimas

Classe n°	Nome da Classe	Reação Catalisada
1	Oxirredutases	Transferência de Elétrons
2	Transferases	Transferência de Grupos
3	Hidrolases	Reações de Hidrólise
4	Liases	Adição de grupos e ligações duplas
5	Isomerases	Transferência de grupos de uma mesma molécula
6	Ligases	Formação de Ligações

Fonte: elaborada pelo autor, 2016.

Dentre estas classes de enzimas, as de maior uso na atualidade são as hidrolases. Essas enzimas efetuam quebras de ligações covalentes através da adição de moléculas de água. Fazem parte deste grupo as lipases, celulasas, amilases e proteases, sendo que esta última, abrange por si só, cerca 40% do total de enzimas comercializadas no setor industrial (GUPTA, 2002). Tais moléculas clivam especificamente ligações peptídicas de proteínas e peptídeos, e estão presentes de forma universal em todos os seres vivos, representando cerca de 2% do total de proteínas existentes em todos os organismos (SILVA, 2013).

A renovação de proteínas é um importante processo em sistemas vivos. Uma vez que as proteínas cumprem seus propósitos, elas devem ser degradadas, de modo que os aminoácidos constituintes possam ser reutilizados em vias anabólicas. Além disso, as proteínas adquiridas por meio da dieta têm de ser degradadas a peptídeos e aminoácidos para melhor absorção intestinal (STRYER et al., 2008). Sob esses aspectos, as proteases são liberadas em meios intra e extracelulares, agindo em vias metabólicas, vias de sinalização celular, assim como na digestão de proteínas. Algumas são expressas na forma inativa (zimogênio), e após a ativação por proteólise parcial, é que elas conseguem efetuar suas funções catalíticas.

A depender do sítio de ação no substrato, as proteases podem ser classificadas em Endopeptidases e Exopeptidases. As Exopeptidases agem preferencialmente nas extremidades C (Carboxipeptidases) ou N (Aminopeptidases) da cadeia (MACIEL MENDES, 2007), enquanto que as Endopeptidases hidrolisam ligações peptídicas alocadas no interior da molécula.

Embora estas enzimas basicamente clivem ligações peptídicas, existem diferenças entre elas individualmente no que diz respeito à posição da ligação hidrolisada e a sequência de aminoácidos adjacentes a essa ligação (VERMELHO et al., 2008). O referido autor ainda cita que por consequência, em 1960 o cientista Hartley propôs um tipo de classificação onde as enzimas seriam divididas de acordo com os grupos químicos do centro ativo envolvidos no mecanismo catalítico. Desta forma, comporiam as carboxipeptidases: as cisteíno, metalo e serino carboxipeptidases. As aminopeptidases, em função do número de resíduos de aminoácidos removidos, recebem a terminação de aminopeptidases (um resíduo), aminodipeptidases (dois resíduos) aminotripeptidases (três resíduos). Por fim, as endopeptidases se dividiriam em serino, cisteíno, metalo e aspárticoproteases (MACIEL MENDES, 2007).

Devido à variedade de reações catalisadas pelas enzimas, elas encontram diferentes aplicações biotecnológicas nas mais diversas áreas.

2.6.1 Aplicações biotecnológicas

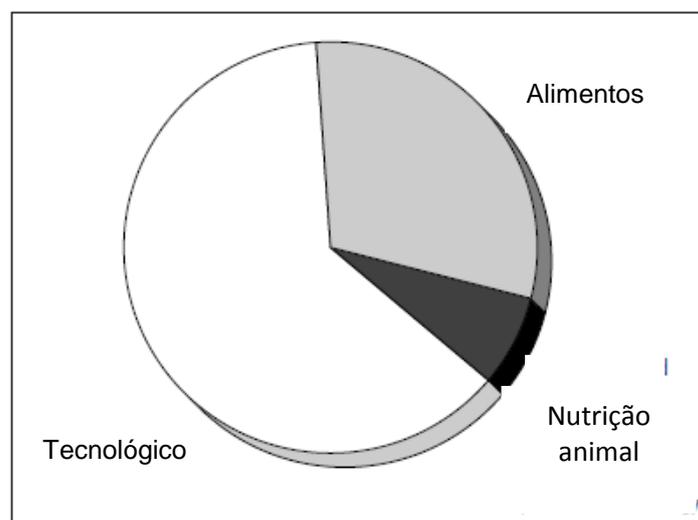
O uso de enzimas em processamentos tecnológicos são datadas de muitos anos, sendo que as várias aplicações das enzimas conhecidas hoje são resultados de grandes investimentos, principalmente nas quatro últimas décadas, as quais estão associadas a implementação da biotecnologia moderna (KIRK, BORCHERT e FUGLSANG, 2002). É importante salientar que essa evolução se deu pela contribuição mútua de diferentes linhas de pesquisa. A saber, exploração genética, associada à estratégias de recombinação gênica, assim como os avanços na área da proteômica, onde foi alcançado maior esclarecimento sobre as funções estruturais de cada macromolécula, assim como a ênfase em estratégias de purificação.

Sabe-se que a maior parte da comercialização envolvendo a produção de enzimas está centrada na comercialização de proteases. O sucesso no uso destas moléculas se deve a fatores como maior degradação, quando comparadas aos catalisadores sintéticos, elevada atividade catalítica, seletividade a substratos específicos, assim como a diversidade de produção uma vez que são sintetizadas por organismos mono e pluricelulares. Em se tratando dos benefícios econômicos, percebe-se que a adequação destas enzimas a insumos processuais favorecem em grandes proporções a economia local, principalmente pelo valor atribuído a molécula comercializada. Comparando os valores de importação e exportação de proteases no Brasil no ano de 2011, vê-se que os saldos da balança comercial foram de US\$ 9,05 milhões de importação, e US\$ 20,69 de exportação (SILVA, 2013). Esse efeito tem como reflexo maior investimento do Brasil no setor, o que induz maior competitividade diante de outros países também envolvidos nessa linha de comércio. Além do mais, confirma-se também por meio desses valores o grande avanço em pesquisa tecnológica associados a estratégias de purificação e produção de proteínas desenvolvidas pelo Brasil nos últimos anos.

Tratando da distribuição de enzimas nos diferentes seguimentos, a análise da **Figura 4** mostra que o setor tecnológico, dominado pelos detergentes, indústrias têxteis, combustíveis, fármacos e indústria química, são responsáveis pelo maior

consumo de enzimas, seguido da indústria alimentícia. Esse tipo de organização está também muito fortemente associado aos avanços tecnológicos destinados a produção, bem como inovação que cada um deles sofreram ao longo dos últimos anos. Em ambos os casos, o critério levado em consideração apontam como prioridade uma maior efetividade de uso. A adição de proteases na criação de detergentes, por exemplo, além de reduzir à níveis mais significativos a agressão ambiental que muitos produtos induzem ao ser expostos ao meio ambiente, assegura seletividade entre a enzima e o substrato que se deseja hidrolisar.

Figura 4: Perfil de Distribuição das Enzimas



Fonte: Kirk, Borchert e Fuglsang, 2002

Sabendo que a indústria alimentícia e de detergentes são as áreas de maior destaque na utilização de proteases (RAO et al., 1998), será mais amplamente discutido sobre as mesmas a seguir.

2.6.1.1 Proteases na indústria de detergentes

A estrutura química das moléculas de detergentes possuem como similaridade a constituição de um sal orgânico, com uma longa cadeia alquílica hidrofóbica, e uma extremidade hidrossolúvel. Assim, as moléculas de detergentes são classificadas como anfipáticas, por possuírem uma região polar (hidrossolúvel), e outra apolar (não solúvel). Esse arranjo molecular faz com que as manchas de gordura, geralmente enriquecidas de conteúdo proteico, sejam retiradas e

engaioladas pela porção alquílica do detergente, e posteriormente retiradas através do fluxo de água.

Os detergentes comerciais mais simples são formados por Alquilbenzeno sulfonato, Sabão, Perborato, Tripolifosfato, Branqueador óptico e Perfume (MACIEL MENDES, 2007); que em conjunto, favorecem a descoloração dos tecidos, evita a produção excessiva de espuma, facilita a retirada de sujeira das roupas, reduz o efeito de encardimento, e disfarça o mau odor dos demais componentes do produto.

A partir da década de 60, passou-se a incrementar nessas soluções enzimas proteolíticas, as quais atuavam em manchas específicas ao degradarem os resíduos orgânicos de origem proteica, permitindo assim a substituição ou a redução de produtos cáusticos, ácidos e solventes tóxicos, que agredem o meio ambiente e promovem o desgaste de tecidos e equipamentos (MITIDIERI et al., 2002). As principais vantagens em se utilizar enzimas proteolíticas como aditivos em detergentes são: a alta economia energética e baixa emissão de CO₂ (visto ser possível lavagens a baixas temperaturas), por substituírem outros compostos como agentes surfactantes e por serem biodegradáveis. Acredita-se que o uso destes materiais modificados favoreceria a lavagem de roupas a 30, em vez de 40 ou 60°C, possibilitando uma economia energética e redução de emissão de CO₂ na Europa de 12 milhões de toneladas, valor equivalente a emissão de 3 milhões de automóveis (www.novozymes.com.br,2015).

Apesar das proteases poderem ser obtidas de diferentes fontes, as mais utilizadas como aditivos em detergentes são aquelas extraídas de bactérias. Foi na década de 60 que teve o início do uso de enzimas oriundas de bactérias, e as primeiras impostas foram *Bacillus amyloliquefaciense* e *Bacillus licheniformis* (MAURER,2004). Hoje, os microrganismos são responsáveis pelo fornecimento de dois terços da produção comercial (KUMAR; TAKAGI, 1999), mas com toda exigência de eficiência catalítica, e rentabilidade no processo de produção, o uso de outras fontes como matéria prima se mostra de grande valia, dentre elas destacam-se as vísceras de peixes como fonte alternativa e de grande potencial de enzimas proteolíticas. Como exemplo cita-se as proteases alcalinas de intestino de Tambaqui (*Colossoma macropomum*), que apresentam características favoráveis à sua utilização como aditivos de detergentes comerciais, especialmente por serem estáveis diante de agentes surfactantes e oxidantes (ESPÓSITO, 2006).

O Brasil, em conformidade com outros países, passou a exercer grande investimento tecnológico, com a finalidade de otimizar seus produtos, assim como aprimorar a eficiência dos mesmos. Esses avanços se deram em diferentes escalas e setores industriais. Com relação ao enfoque desta seção, por exemplo, tem-se que aproximadamente 80% dos detergentes comercializados apresentam pelo menos uma enzima proteolítica como aditivo biotecnológico, e obviamente, com eficiência imensuravelmente superior aos outros produzidos de forma tradicional (www.novozymes.com.br,2015).

2.6.1.2 Proteases na indústria alimentícia

O uso de proteases em processos industriais destinados a fabricação de alimentos e bebidas são uns dos mais observados. Como exemplo cita-se a fabricação de cervejas, maturação de queijos, amaciamento de carnes, produção de hidrolisados funcionais, panificação, produção de adoçantes artificiais e na recuperação e aproveitamento de resíduos e subprodutos (RAO et al., 1998). Entre os efeitos positivos que se espera no processamento de alimentos, há aqueles relacionados com o valor nutricional e funcional, incluindo maior absorção, modificações sensoriais (textura e sabor) assim como melhoria na capacidade antioxidante ou redução de compostos alergênicos (VAN BOEKEL, 2010).

No início, quando a enzimologia estava ainda em ascensão, as estratégias escolhidas como forma de modificação das propriedades funcionais das proteínas eram através de tratamentos com substâncias ácidas, que por sua vez, ocasionavam alterações químicas em parte das moléculas constituintes, principalmente de moléculas proteicas (THYS, 2004). Em contra partida, o uso inovador de enzimas proteolíticas assumiram inúmeras vantagens, quando comparado a esses outros agentes, as quais se destacam: especificidade, ausência de toxicidade e baixas concentrações são necessárias. Na realidade, a hidrólise proteica é uma estratégia imposta com a finalidade de agregar valor, funcionalidade, e ampliação do leque de aplicações para materiais de pouca utilização convencional, subprodutos e resíduos da indústria alimentícia (THYS, 2004). Sob aspectos nutricionais, representa a oportunidade de conferir textura a proteína, alterar a capacidade espumante, de coagulação e emulsificação, assim como remoção de sabores e odores indesejáveis (LLORENTE ET AL., 2014). Além do mais, não altera

o valor nutricional do composto, sendo as modificações ocasionadas durante o processo decorrentes da maior ou menor especificidade da enzima pelo substrato empregado.

A ação hidrolítica nas moléculas de proteína faz também com que os peptídeos e aminoácidos gerados assumam maiores níveis de solubilidade. Isto, por sua vez, se deve ao fato dos produtos da hidrólise serem menores, quando comparados com a proteína original, assim como maiores quantidades de grupos passíveis de efetuarem ligações de hidrogênio. Segundo Zhao et al. (2011), o tratamento enzimático com alcalases de um extrato proteico de amendoim resultou no aumento da solubilidade do material, ao passo que favoreceu uma diminuição no critério de hidrofobicidade da amostra. Outros artigos também comprovam os mesmos resultados (CHEN, 2012; PANYAM e KILARA 1996).

Uma das aplicações inovadoras de proteases está também relacionada a hidrólise de proteínas de soja, de forma a torná-la solúvel para a utilização em bebidas refrescantes (WISEMAN, 1991). Bernardi et al. (1991) verificaram um aumento bem significativo na solubilidade da proteína, capacidade de formação de espumas, assim como em sua estabilidade. Além disso, observaram que a ação hidrolítica das proteases extraídas de bactérias se mostraram bem mais efetivas quando comparadas com as enzimas extraídas de fungos. Este evento é muito comum, visto que modificações na cadeia principal das proteínas acarretam em perfis de hidrólise diferenciados tanto em pH, como em temperaturas diferentes.

Outro importante uso de proteases em insumos alimentícios provém dos processamentos de leite e seus derivados, principalmente aqueles destinados a coagulação. Segundo Rao et al., (1998), a ação inicial das proteases seriam promover a hidrólise da ligação peptídica de Phe105 - Met106, gerando *p*-k-caseína, e macropeptídeos, além da participação de proteases no enriquecimento proteico do Whey (subproduto da fabricação de queijos), através da maior taxa de solubilização das proteínas hidrolisadas.

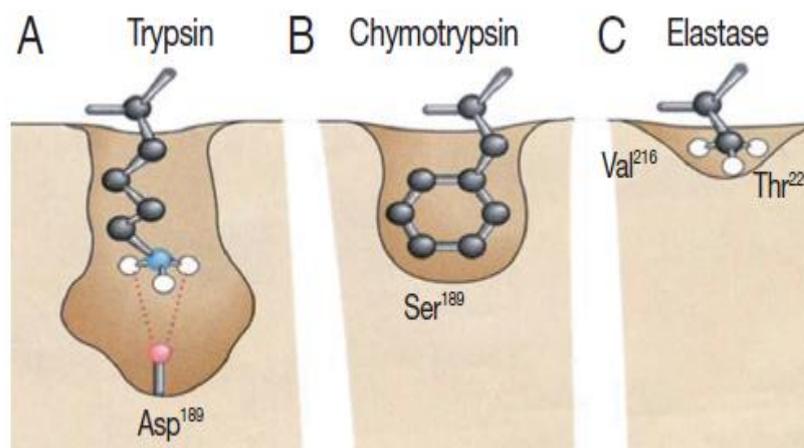
Como abordagem final da ação proteolítica, retrata-se a formação de peptídeos bioativos. De acordo com Biesalski et al. (2009), são obtidos da natureza, e fazem parte da cadeia alimentar de todo o indivíduo, direta ou indiretamente. Além dos benefícios nutricionais, pode-se dizer que estas substâncias promovem outras importantes contribuições, como equilíbrio no estado oxidativo.

Dentre as possíveis moléculas enquadradas nessa categoria destacam-se os peptídeos bioativos, oriundos da hidrólise de macromoléculas proteicas com sequências de aminoácidos bastante particular. Hoje já se conhece inúmeras correlações da ação destes com o melhor funcionamento fisiológico: ação cardiovascular, nos sistemas imunológico, nervoso e digestivo (SIRTORI et al, 2009; HERNANDEZ-LEDESMA, 2011). Basicamente, o processo metabólico envolvido na formação de peptídeos bioativos oriunda da ação de protases, tanto aquelas envolvidas em processos digestivos, quanto as participantes da fermentação (TAVANO, 2013).

2.6.2 Tripsina

De todas proteases mencionadas na seção anterior, as Serinoproteases são amplamente estudadas, por estarem envolvidas em vários processos fisiológicos, tais como a digestão, a apoptose, transdução de sinal, controle do ciclo celular e coagulação do sangue (NEURATH, 1986). As Serinoproteases são assim denominadas, por possuírem um mecanismo catalítico que envolve um resíduo de serina ativado, particularmente reativo em seu sítio catalítico (MINAYA, 2012). Além disso, enzimas enquadradas nessa categoria, possuem em comum a participação de outros aminoácidos, que são a Histidina (His) e Aspartato (Asp) (YANG, 2015). A depender da especificidade com seus substratos, as serinoproteases digestivas podem ser subdivididas em três categorias: tripsina, quimotripsina e elastase, como pode ser visto na **Figura 5**.

Figura 5: Subdivisão das Serinoproteases Digestivas



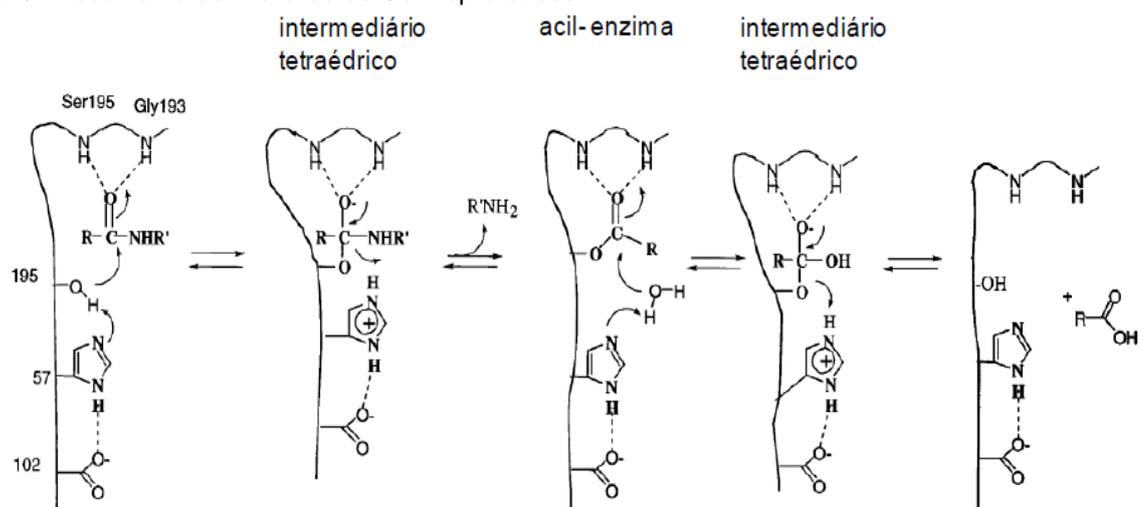
Fonte: Yang, 2015

A tripsina contém um resíduo de aspartato carregado negativamente no sítio ativo da molécula, o qual favorece a hidrólise de ligações peptídicas na extremidade carboxiterminal de resíduos de lisina (Lys) e arginina (Arg), os quais são aminoácidos carregados positivamente. As enzimas, assim como as demais proteínas são inteiramente dependentes da estrutura primária de sua cadeia polipeptídica, de modo que uma única modificação num resíduo de aminoácido, poderá culminar em uma drástica alteração funcional. Com relação a hidrólise de ligações peptídicas dos resíduos anteriormente citados, a ocorrência de prolina nas regiões adjacentes a estes aminoácidos dificulta o acesso do substrato ao sítio ativo da tripsina (www.novozymes.com.br,2015), já que se trata de um aminoácido mais rígido, tornando a estrutura menos específica ao estado de transição do complexo enzima substrato.

A quimotripsina, por sua vez, age seletivamente em resíduos hidrofóbicos como o triptofano (Trp), fenilalanina (Phe) e tirosina (Tyr). Por fim, tem-se a elastase, que por seu sítio catalítico ser menor que os da tripsina e quimitripsina, agem preferencialmente em aminoácidos pequenos como alanina (Ala), glicina (Gly) e valina (Val) (YANG, 2015).

O mecanismo de hidrólise envolvendo serinoproteases pode ser observado por meio da **Figura 6** a seguir:

Figura 6: Mecanismo de Hidrólise de Serinoproteases



Fonte: Reis, 2009.

Através do mecanismo é possível ver que o ataque nucleofílico ocorre a partir da hidroxila do aminoácido Serina, na posição 195. É importante mencionar que

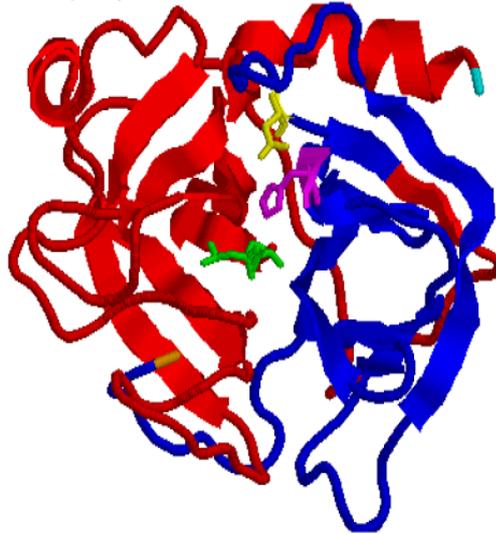
essa hidroxila protonada precisa ser “ativada”, caso contrário, formaria um intermediário extremamente instável (oxigênio com três valências acomoda carga parcial positiva, extremamente instável nesse elemento eletronegativo). Assim, a aproximação deste aminoácido com o resíduo de histidina na posição 57 faz com que a hidroxila da serina seja desprotonada, tornando este oxigênio da hidroxila com carga elétrica parcialmente negativa.

Em termos de reatividade, esta carga negativa em um átomo eletronegativo, como o oxigênio, faz com que a energia do orbital molecular ocupado (HOMO) deste resíduo de aminoácido aumente consideravelmente, tornando-o ainda mais propício ao ataque nucleofílico (CAREY, 2007). Por si só, o anel imidazólico da histidina possui expressiva basicidade, em decorrência do par de elétrons livres em um dos átomos de nitrogênio. No entanto, ao se aproximar do terceiro aminoácido envolvido na tríade catalítica, aspartato (posição 102), o mesmo pode efetuar uma ligação de hidrogênio com a histidina, o que acarretaria em um aumento no pKa para a mesma, tornando-a ainda mais básica, e conseqüentemente, promovendo uma interação mais efetiva entre ela e a hidroxila da serina.

À medida que o substrato se aproxima da tríade catalítica, o oxigênio da hidroxila efetua um ataque nucleofílico no grupo carbonil, formando um intermediário tetraédrico, e o oxigênio da carbonila assume uma carga parcial negativa. Esta carga por sua vez, pode sofrer efeito estabilizador por meio de ligações de hidrogênio de outros aminoácidos posicionados num bolsão da enzima denominado de oxiânion (STRYER, BERG e TYMOZKO, 2006). O intermediário formado é extremamente instável, e ao reestabelecer a ligação dupla da carbonila, ocorre uma ruptura no intermediário entre o carbono e o grupo amino, facilitada também pela protonação do aminoácido histidina. A água que entra é também desprotonada e a hidroxila gerada ataca a carbonila, mais uma vez formando um intermediário tetraédrico. Por fim, a ligação dupla da carbonila é reestabelecida, e conseqüentemente regenerando o estado inicial da enzima para mais uma reação.

Nos seres humanos, a tripsina é produzida no pâncreas, na forma inativa, chamada de tripsinogênio (zimógeno). Sua molécula (Beta) consiste em uma única cadeia polipeptídica formada por dois domínios de estruturas similares unidos de forma assimétrica, que em cuja interface estão inseridos os resíduos de aminoácidos catalíticos (REIS 2009). A estrutura tridimensional da β -tripsina pode ser vista na **Figura 7**.

Figura 7: Estrutura Tridimensional da β -tripsina Pancreática Bovina.



Fonte: Reis, 2009.

Através da **Figura 7** pode ser observado na estrutura da tripsina o primeiro domínio, representado em azul (1-105aa), seguido do outro domínio em vermelho (106-223aa). O N-terminal da molécula é mostrado em laranja, e C-terminal em cor azul claro. Finalmente, mostra-se a tríade catalítica: Ser (amarelo); His (lilás) e Asp (verde) (REIS, 2009).

Durante a digestão, quando os alimentos previamente degradados pela pepsina chegam ao intestino, ocorre a liberação de tripsinogênio, onde sofre a ação hidrolítica da enteropeptidase, liberando na forma ativa a tripsina (STRYER, BERG e TYMOZKO, 2006), a qual propicia a continuidade da hidrólise das proteínas previamente digeridas, bem como promove a ativação de outras moléculas proteicas.

Esse tipo de ativação é estabelecido pela exposição do sítio catalítico da molécula, que até então encontrava-se impedido. Em se tratando de outra proteína, a definição comumente escolhida pelos bioquímicos ao se referirem aos precursores são: pró-proteínas ou pró-enzimas, dependendo da natureza da molécula (NELSON e COX, 2013).

Para o tripsinogênio, a ação hidrolítica da enteropeptidase desencadeia a remoção do hexapeptídeo a partir da extremidade N-terminal, H₂N-Val-Asp-Asp-Asp-Asp-Lys (DELAAGE, et al., 1967), sendo que recentemente, Ogawa et al. (2014) verificaram o efeito auto ativador do tripsinogênio intermediado por interação específica com carboidratos. Com esse estudo, os pesquisadores puderam certificar-se de que a ativação secundária do tripsinogênio, desencadeada pela ação direta de

moléculas de tripsina ativas estaria sofrendo efeito regulatório a partir de moléculas glucanares, associadas a forma inativa (zimógeno). Além disso, puderam concluir que a ação inibitória estaria atribuída não necessariamente a tripsina ativa, mas através da mudança estrutural do tripsinogênio, visto que a taxa de hidrólise da tripsina ativa não mostrou alterações após incubação com os carboidratos estudados.

É de fundamental importância que a tripsina seja disponibilizada apenas nos momentos de interesse fisiológico, caso contrário, favoreceria ao efeito nocivo denominado de pancreatite (SAHIN-TOTH, 2006). Desta forma, acredita-se que a associação intermolecular do tripsinogênio com moléculas glicanas representa mais um novo mecanismo endógeno, destinado a regulação indireta contra a hidrólise intermediada por tripsina (auto ativação do zimogênio).

Por abranger importantes processos metabólicos, sejam em bactérias ou vertebrados, estudos destinados a purificação e caracterização de tripsinas tem crescido de forma bastante considerável. Além do isolamento em si, análises mais refinadas puderam também testificar importantes características à cerca da estrutura primária, amplo conhecimento de suas atividades, assim como estudos cinéticos destinados ao processo catalítico desempenhado por essas moléculas. Como exemplo, citam-se tripsina purificada de ovelhas (ZWILLING et al., 1969), cão (PINSKY et al., 1985), humano (JOHNSON e TRAVIS, 1976), rato (GNDRY e LAUNAY, 1988), porco (CHARLES et al., 1963), galinha (GUYONNET et al., 1999) e peixe (MARCUSCHI et al., 2010).

O manejo alternativo de tripsinas como aditivo em produtos industrializados abrange hoje uma vasta dimensão, tanto farmacológica, análises química, quanto na produção de detergentes. Estima-se que neste, a tripsina foi introduzida pela primeira vez em 1913, pelo químico alemão Otto Röhm (HERBOTS et al., 2008), sendo que o primeiro produto disponibilizado no mercado com essa formulação ocorreu apenas 46 anos mais tarde, produzido por Gebrüder Schnyder, e em 1985, somando cerca de 80% do total de detergentes comercializados (VOJCIC et al., 2015). O enquadramento de tripsinas como um bom aditivo em detergentes está associado à avaliação de múltiplos fatores. Dentre esses fatores pode-se destacar a ampla ação da tripsina em pH alcalino, assim como em diferentes temperaturas (de baixas temperaturas para fibra sintéticas, e de altas para fibras de algodão). Por fim, destaca-se a sua estabilidade cinética frente aos demais constituintes do produto.

Sobre ações farmacológicas, pode-se citar a contribuição da tripsina sobre efeitos dietéticos na indústria alimentar, o que reflete direta, ou indiretamente num maior estado nutricional, bem como uma terapia alternativa para pacientes com disfunção pancreática (KIM, 2014). Normalmente estas moléculas são obtidas a partir de extratos de pâncreas bovinos e suínos, sendo que a série de epidemias configuradas nos últimos anos tem despertado um estado de alerta por parte dos profissionais da área, visto o risco de contaminação ser de certa forma real após administração clínica com esse material. Como uma das soluções alternativas, tem-se pensado na técnica de recombinação com células vegetais, por exemplo, a partir do milho transgênico (*zeamays*) (WOODARD,2003). No entanto, um dos maiores entraves relacionados a esta técnica refere-se ao custo benefício associado a purificação, podendo atingir cerca de 80% do custo total (KUSNADI et al.,1997; XU et al.,2012; TIAN e at., 2011; SCHILLBERG et al., 2005).

Em estudos desenvolvidos com células de arroz transgênico, Kim et al. (2011) e colaboradores obtiveram 15 mg/L de tripsina de pâncreas bovino até o quinto dia de cultivo das células, compreendendo cerca de 7,5% do total de enzimas secretadas por estas células em meio de cultura.

Em análises químicas, a tripsina purificada é usualmente empregada na espectrometria de massas, como forma elucidativa da massa molecular de proteínas, assim como aferir o sequenciamento de alguns dos peptídeos constituintes. Nesta análise, as bandas das proteínas contidas no gel de eletroforese devem ser retiradas antes de serem investigadas. Em seguida são hidrolisadas por meio de um tratamento enzimático com tripsina. Assim, a depender do perfil de fragmentação, torna-se possível correlacionar os resultados obtidos com alguns bancos de dados apropriados, e conseqüentemente determinar a classe e subclasse da proteína em questão (UPADHYAY et al., 2015; BAJAJ et al., 2015 e WEI, 2009).

De forma preponderante, a biotecnologia visa cada vez mais a otimização, melhor desempenho, e principalmente, o uso de produtos com elevado potencial biotecnológico. Dentre as possíveis possibilidades, destaca-se o reaproveitamento de descartes da aquicultura, já que assumem forte potencial biotecnológico.

Atualmente, inúmeros trabalhos têm sido desenvolvidos com a finalidade de isolar e purificar tripsina a partir de vísceras de peixes e demais espécies aquáticas (FRANÇA. 2013; ESPÓSITO, 2009. BALTI et l., e 2009 BEZERRA, 2005) Em ambos os casos, percebe-se estreita similaridade entre estas moléculas, com respeito a

massa molecular (23-24 kDa), especificidade cinética (BOUGATEF et al, 2013) enquadrando-se como serinoproteases, e estabilidade frente a mudanças de temperatura (20-60 °C) e pH (6,0- 10,0).

2.7 Purificação de Proteínas

Para que as propriedades e atividades de uma proteína possam ser determinadas, estas devem estar na sua forma pura (NELSON e COX, 2013). Essa purificação deve ser tomada a partir do tecido, célula, ou qualquer outro tipo de material biológico que a proteína de estudo esteja inserida, o que é chamado de extrato bruto (AUGUSTO, 2012). Nesse processo de extração a intervenção mecânica é em alguns casos fundamental, tanto para fragmentação de tecidos, por exemplo, quanto em processos de ultrafiltração, para separar proteínas de suspensões de bactérias e fungos. Nestes casos, é importante que o pesquisador se preocupe com a integridade estrutural da molécula, caso contrário encontrará dificuldades durante sua análise, ou até mesmo deixará de realizar o processo, visto que tais procedimentos podem influenciar na catálise realizada (em casos de enzimas), e essa por sua vez, é a forma metodológica mais plausível na identificação da proteína.

Concluído esse procedimento, o próximo passo é a separação do material em diferentes frações, de forma que se consiga concentrar a proteína alvo em uma única fração, e os demais contaminantes serem gradativamente retirados do meio. Normalmente, o critério levado em conta é a propriedade química da proteína, como tamanho, solubilidade, carga (positiva ou negativa), e por fim, especificidades químicas dos grupos presentes, ou seja, suas propriedades de interação com outras moléculas.

A estratégia comumente utilizada é a adição de sal, visto que a solubilidade de moléculas proteicas são reduzidas em meio salino. A escolha do sal também é de extrema relevância, de forma que o mesmo não venha intervir na atividade da molécula. Há quem até desconsidere esse procedimento numa tentativa de purificação, ou mesmo parta de outro princípio, aderindo à precipitação com etanol, por exemplo, (LI et al., 2016; SCHULZE et al., 2016; MÁRCIA et al., 2015), mas isso está muito relacionado com o perfil da amostra de trabalho. Normalmente, antes mesmo de expor uma resina cromatográfica, faz-se necessário que o pesquisador

saiba, de forma mais aproximada possível, o grau concentração, e o nível de diversidade das proteínas contidas no extrato. A vantagem de executar uma precipitação, salina ou com solventes orgânicos, é a possibilidade de refinamento da amostra, ou seja, retirar uma considerável quantidade de moléculas contaminantes, as quais por apresentarem estruturas com propriedades químicas similares estarão agrupadas e separadas das demais. Ao fim do fracionamento, e conseqüentemente identificada à porção em que a proteína de interesse encontra-se, deve-se retirar o soluto adicionado (sal ou solvente orgânico), pois o mesmo poderá interferir na resolução e efetividade de experimentos adicionais, como os cromatográficos. Uma metodologia comumente utilizada para este procedimento é a diálise, onde se deposita o extrato proteico em uma membrana semipermeável, a qual favorece a saída do soluto usado na precipitação, mas mantém as proteínas e peptídeos no interior da membrana.

Pode-se dizer que dentre os métodos conhecidos na atualidade, a cromatografia líquida é uma refinada técnica, e de grande efetividade na purificação de proteínas. Nela, as proteínas podem ser fracionadas a partir de diferentes critérios: tamanho, carga elétrica, especificidade pelo substrato, entre outros. Na cromatografia por filtração em gel, a matriz (fase estacionária) é composta por esferas, contendo micro poros, os quais retardarão ou não as proteínas aplicadas na coluna. Com essas características, as moléculas de maior peso molecular são eluídas mais rapidamente, enquanto que as menores, traçam um caminho mais prolongado e demorado, visto conseguirem penetrar os poros compatíveis com o seu tamanho. Na gel filtração, fatores como volume da amostra aplicada, tamanho dos *Bids* (esfera), altura da coluna e fluxo da cromatografia, afetam drasticamente na resolução do experimento. Quanto maior a altura da coluna, mais efetiva será a cromatografia (separação da amostra).

Normalmente há uma relação matemática, de forma que ao quadruplicar o tamanho da coluna, aumenta-se num fator de dois o seu poder de resolução. É importante mencionar que o volume da coluna engloba o espaço ocupado pelas esferas, assim como o volume remanescente, ou seja, o espaçamento não ocupado, denominado de void ou volume morto (20-30 % do volume total).

Por outro lado, quanto menor o volume da amostra aplicada, e menos viscosa ela for, mais efetiva será a cromatografia. Neste caso é aconselhado aplicar um volume de amostra apenas 2% do volume total da coluna, e em caso de separação

de complexos apenas 0,5%. Amostras muito viscosas impossibilitam a penetração na coluna, e pode comprometer a integridade da mesma, visto ser vulnerável a entupimentos. Mesmo sendo uma análise “teoricamente” isenta de adsorção, muitos optam em operá-la com uma ligeira concentração salina, assegurando ao máximo que o critério de separação seja exclusivamente a massa das proteínas (NGOC et al., 2015; ZHAO, et al., 2015; ODDEPALLY et al., 2013).

Esse tipo de diferenciação entre as moléculas pode ser em algumas situações considerado como algo de pouca seletividade, principalmente quando o material trabalhado é de grande complexidade proteica. Entretanto, o uso de cromatografias por gel filtração se mostra de grande importância, pois ainda que não atinja o êxito com apenas esse processo, a sua escolha influencia em grandes proporções a separação de proteínas e demais contaminantes. Como exemplo cita-se o trabalho feito por Villalba et al. (2013), onde conseguiram purificar tripsina do *Pterygoplichthys disjunctivus*, com o uso de três cromatografias líquidas, das quais cita-se a gel filtração, com a coluna Sephadex G-75.

A escolha da resina, e conseqüentemente a especificidade dos bids são fortemente associados ao tipo de molécula que se deseja purificar, isto é, peptídeos, proteínas, polissacarídeos e muitos outros. Como exemplo pode-se citar a Sephacryl S-100, popularmente conhecida como uma coluna cromatográfica de alta resolução, concebida para a separação de peptídeos e proteínas globulares, e cuja faixa de fracionamento varia de 1×10^3 a 1×10^5 . Outras séries já são também distribuídas, com diferentes faixas de fracionamento, o que possibilita ao pesquisador, uma melhor adequação ao estudo que se pretende efetuar: Sephacryl S-200 coluna de alta resolução, destinada à purificação de anticorpos e proteínas de tamanho médio, sua faixa de fracionamento para proteínas globulares varia de 5×10^3 - $2,5 \times 10^5$, Sephacryl S-300 usada na purificação de anticorpos, e proteínas de tamanho médio com uma faixa de fracionamento de 1×10^4 - $1,5 \times 10^6$, Sephacryl S-400 separa polissacáridos, macromoléculas com estruturas prolongados e mesmo partículas pequenas, tais como plasmídeos, e S-500, cujos critérios de separação alcança a ordem de 2×10^4 - 8×10^6 e 4×10^4 - 2×10^7 , respectivamente (GE Healthcare Life Sciences, 2016).

Outro método também bastante efetivo é a cromatografia por troca iônica, em que as proteínas são adsorvidas nas matrizes carregadas, seguidas de um fracionamento por meio de um gradiente salino e/ou de pH. Normalmente ela é

utilizada na separação de proteínas, peptídeos, ácidos nucleicos e outras biomoléculas (MACALDOWIE et al., 1998; BKHAIRIA et al., 2016; KHANGEMBAM e CHAKRABATI, 2015). Nesta técnica, a resina (matriz), que pode ser a base de compostos inorgânicos, resinas sintéticas ou polissacarídeos, são carregadas positiva, ou negativamente. Quando a amostra proteica for inserida, as proteínas de cargas contrárias ficarão retidas, enquanto que as demais, são “descartadas” durante a lavagem da coluna. É importante mencionar que antes da aplicação, é de fundamental importância que a coluna seja previamente equilibrada. Assim, há uma adequação do ambiente químico no interior da coluna para adsorver proteínas com cargas opostas a matriz. Quanto às vantagens da técnica, tem-se que é um método bastante simplificado, com alto controle do processo, elevada capacidade, e alto poder de resolução.

Inúmeras resinas são disponibilizadas no mercado, com diferentes parâmetros de análise, e com recursos químicos estritamente relacionados ao que se pretende trabalhar. Como exemplo tem-se a família UNOsphere, resinas de troca catiônica (UNOsphere S e UNOsphere Rapid S) que assumem significativa estabilidade e integridade frente a alterações no pH, durante a etapa de eluição (BIO RAD, 2016). Esse tipo de comportamento também possibilita uma maior versatilidade de proteínas a ser trabalhada, a exemplo da tripsina bovina purificada por meio de uma troca catiônica, com a coluna SE-Sephadex-C50 (LACERDA et al., 2014)

Na cromatografia por afinidade tem-se a ocorrência de grupos específicos, os quais se ligam, por meio de interações químicas fracas, a compostos presentes propositalmente, na coluna cromatográfica. Esse tipo de cromatografia, está baseado no bio-reconhecimento, onde a proteína a ser isolada, deve por exclusividade, possuir interação atrativas pelos grupos aderidos à coluna.

Geralmente, este sítio de ligação está relacionado ao sítio ativo da molécula (para enzimas), sendo por isso uma ferramenta de alta especificidade. Da mesma forma que as cromatografias de troca iônica, há necessidade de se desprender as moléculas presas, e para isso, aplica-se o uso de alterações brandas no pH, adição de sal, ou aumento na concentração de outro composto, também específico ao ligante contido na coluna. Normalmente esse tipo de análise é utilizado em rotas de purificação de proteínas como lectinas, grupo específico de proteínas que tem a especificidade química em se ligar a diferentes tipos de carboidratos (XIU et al.,

2015; VASCONCELOS et al., 2015), bem como em trabalhos destinados a purificação de tripsina, como a coluna HiTrap Benzamidine FF (GE healthcare, 2009)

Para que o processo de purificação alcance resultados satisfatórios, quatro variáveis (**Figura 8**) devem ser levadas em consideração, de forma que sem o seu cumprimento, a purificação poderá ser impossibilitada, e se possível, com baixa efetividade do método.

Figura 8: Variáveis Utilizadas no Processo de Purificação de Proteínas



Fonte: elaborada pelo autor, 2016.

É muito importante que as ferramentas escolhidas no processo purificação consigam suportar, o total de amostra a ser purificada, caso contrário, propiciará a perda do material, ou mesmo a inviabilidade econômica do método. Esta é a primeira variável e está relacionada à **Capacidade** de separação. Normalmente, os fabricantes de resinas cromatográficas fornecem informações precisas à cerca do total de proteína que a coluna consegue suportar, o que evita, por exemplo, que seja danificada. A segunda variável refere-se à **Velocidade**. A maioria dos estudos realizados na área da proteômica apresenta uma finalidade comum: a possibilidade de serem reproduzidos a níveis comerciais. Desta forma, metodologias que demandam muito tempo podem encarecer o processo, e em alguns casos, torná-los improdutivos, uma vez que nem todas as proteínas conseguem conservar a sua integridade estrutural por longo período. Como terceira variável tem-se a **Resolução**, que mostra quão separada a proteína estudada é obtida ao término da purificação. Isso significa que proteínas que compõem a amostra devem ser separadas e coletadas em diferentes momentos da cromatografia, de forma a

concentrar a molécula alvo em frações únicas, separadas das demais moléculas existentes. Por fim, tem-se o critério de **Recuperação**, que via de regra, representa uma das mais importantes, se não, a mais importante variável. Não basta apenas purificar uma proteína, é de fundamental importância que a análise atinja níveis de recuperação aceitáveis, e que a estratégia utilizada durante a análise consiga manter em quantidades significativas o alvo de estudo.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

Purificar e caracterizar a tripsina a partir do ceco- pilórico do Pacamã (*Lophiosilurus Alexandri*)

3.2 Objetivos Específicos

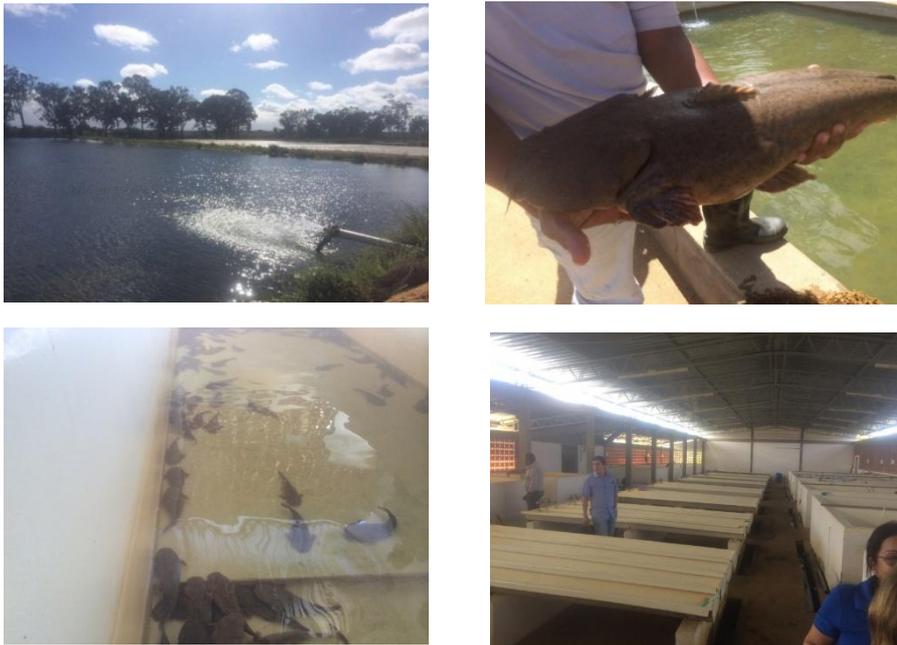
- Localizar a região produtora da enzima.
- Isolar a enzima tripsina a partir do ceco pilórico do Pacamã
- Realizar estudo cinético à cerca da estabilidade da enzima purificada frente a mudanças de temperatura e pH.
- Obter as constantes cinéticas K_m e K_{cat} frente a reações com o substrato BApNA em diferentes concentrações.
- Caracterizar a enzima purificada frente inibidores específicos.

4 METODOLOGIA

4.1 Obtenção das Vísceras

Os Pacamãs (*L. alexandri*) foram obtidos junto à Companhia de Desenvolvimento dos Vales do São Francisco e Parnaíba (CODEVASF) dos estados de Alagoas e Pernambuco (**Figura 9**).

Figura 9: CODEVASF (Porto Real do Colégio/ AL; Petrolina/PE)



Fonte: elaborado pelo autor, 2016.

Após o sacrifício dos animais, as vísceras foram extraídas, estocadas em embalagens plásticas lacradas e imediatamente congeladas. Todo o processo foi previamente aprovado conforme as normas do Colégio Brasileiro de Ética em Experimentação Animal, COBEA, da Declaração de Helsinque e sobre orientação do Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA) da UFAL (Projeto 23/2013)

4.2 Preparo de Extrato Bruto

Cinco vísceras foram descongeladas e em seguida, com o auxílio de pinças, tesoura e bisturi, dissecadas. Após a separação dos cecos pilóricos, o material foi pesado em uma balança analítica (Marte AY220) (0,3636g) e adicionado em um Béquer de 10 mL contendo 8,0 mL do tampão de extração (Tris HCl 50 mM pH 8,0). Para a extração das enzimas foram macerados com um homogeneizador de tecidos

(HOMOMIX, Ser. No.: 175315) durante 5 min em alta rotação a 0°C. Finalizada a etapa, o homogenato foi transferido para tubos Eppendorfs de 2,0 mL, onde fora submetido a centrifugação durante 40 segundos a 14.000 rpm em temperatura ambiente (Centrifuge HT, modelo MCD-2000). O sobrenadante retirado de cada Eppendorf foi coletado e definido, após sua reunião, como extrato bruto.

4.3 Precipitação com Sulfato de Amônio

O fracionamento escolhido é mostrado na **Tabela 2**, e ambas as etapas de precipitação foram realizadas a 15,000 g a 4°C por 10 min, com uma centrífuga refrigerada (HERMLE- Z236K).

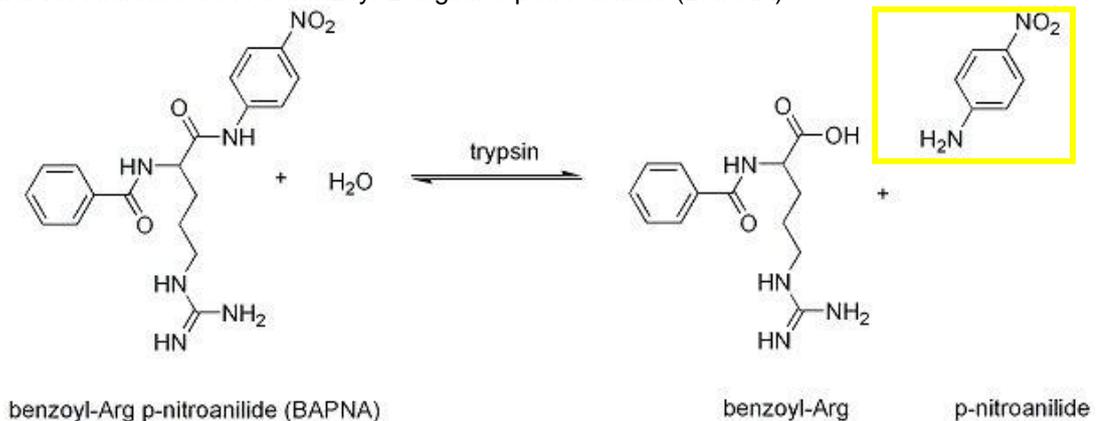
Tabela 2: Precipitação Salina

Fração (%)	Massa de (NH ₄) ₂ SO ₄ (g)
0-20	1,272
20-40	1,469
40-60	1,740
60-80	1,935
80-100	-

Fonte: elaborada pelo autor, 2016

Após a precipitação, as frações coletadas foram submetidas a ensaios enzimáticos, com substrato cromogênico N- α -benzoyl-L-arginine-p-nitroanilide (BAPNA) preparado em DMSO à concentração de 50 mM. Nessa reação, um dos produtos da hidrólise é o p-nitroanilina, cuja coloração amarela é monitorada a 410 nm (**Figura 10**).

Figura 10: Hidrólise do N- α -benzoyl-L-arginine-p-nitroanilide (BAPNA)



No monitoramento, foi aplicado 3 μL das respectivas frações, 397 μL de tampão de extração e 100 μL de solução reveladora (2 μL de BApNA 50 mM + 98 μL de tampão de extração). A reação se processou por 30 min, a temperatura de 37°C em um Banho Maria (Dellta BA-MG MOD. 105 D). Ao término do tempo estipulado, a reação foi interrompida usando 500 μL de ácido cítrico 20 % (m/v), e aferido a absorbância à 410 nm no espectrofotômetro.

4.4 Cromatografia Líquida

As frações de maior atividade foram reunidas e aplicadas em uma coluna cromatográfica DEAE-Sepharose (30 mL), trocadora de ânions, onde o tampão de equilíbrio foi 50 mM Tris-HCl pH 8,0 (A), e para eluição, 50 mM Tris-HCl pH 8,0 + 0,5 M de NaCl (B), aplicando um gradiente de 0-100% do mesmo, a um fluxo de 0,5 mL/min em 40 volumes de coluna. Para o monitoramento das 80 frações coletadas foi usado 60 μL de solução reveladora (59,6 μL de TE +0,4 μL de BApNA 50 mM) e 40 μL das frações coletadas. A reação foi processada à temperatura de 37 °C, e após 30 min, adicionou-se 100 μL de ácido cítrico 20 % (m/v), para bloqueio da reação.

4.5 Calculo de Unidades Enzimáticas

A atividade amidase, hidrólise do Bapna, foi calculada de acordo com a fórmula abaixo:

$$\text{Atividade (U/mL)} = \frac{(A-A_0) \times \text{volume final de mistura (mL)} \times 1000}{8800 \times \text{tempo de reação (min)} \times 0,2 \text{ (mL)}}$$

8800 $\text{M}^{-1} \text{cm}^{-1}$ é o coeficiente de extinção do p-nitroanilina; A e A_0 são a leitura das amostras e do branco a A_{410} nm respectivamente.

4.6 SDS-PAGE, Eletroforese Nativa e Zimografia

As eletroforeses foram feitas a voltagem constante, em gel de poliacrilamida com dodecil-sulfato de sódio (SDS-PAGE) 12 e 15%, usando 5% e 15% (m/v) para os géis de empilhamento e separação respectivamente (LAEMMLI, 1970). O tampão

das amostras foi 0.5 M Tris-HCl pH 6.8; 2% SDS; 10% Glicerol; 5% 2-Mercaptoetanol; 0,001% de azul de Bromofenol e aquecida por 5 min a 100°C. Para detecção das bandas correspondente as proteínas, foi usado coloração com nitrato de prata: 0.4 g de Nitrato de Prata AgNO_3 foram diluídos em 2,0 mL de água, em seguida adicionado à solução B (126 μL de NaOH (10M) + 48 mL de Água Deionizada), permanecendo nesta por 15 min. Posteriormente, os géis foram lavados com água e adicionados a solução C (25 μL de ácido cítrico; 25 μL de formaldeído e 50 mL de água) até as bandas serem visualizadas. A massa aproximada da enzima foi estimada com marcador de peso molecular (Amersham™ Full-Range Rainbow™ (12000-225000 Da). Quanto a eletroforese nativa, seguimos o mesmo protocolo, sendo que nestas, as amostras não foram submetidas a aquecimento, nem redução com 2-mercaptoetanol. No preparo do zimograma o gel foi polimerizado com a adição de Caseína 0.2%, e após eletroforese, o mesmo foi lavado com Triton X-100 2.5% em tampão de extração por 30 min sob agitação, para a retirada do SDS. Em seguida, adicionamos 100 mL de tampão de reação, permanecendo neste por 48 h a 25°C. Ao fim, o gel foi mergulhado em 0.2% Coomassie Brilliant Blue G-250 em H_2O : Metanol (1:1), e posteriormente lavado com solução descorante (50% metanol e 10% ácido acético).

4.7 Determinação da Concentração de Proteína

A concentração da proteína foi determinada pelo método de Bradford (1976), usando albumina de soro Bovino como padrão (250-0,009 $\mu\text{g}/\text{mL}$). Para isso foram tomados 10 μL das amostras diluídas (1:10), adicionados 790 μL de Água e 200 μL de reagente de Bradford. Posteriormente as amostras foram incubadas por 5 min, e medido a absorbância a 595 nm. As unidades correspondentes são (mg/mL) de proteína.

4.8 Teste de pH Ótimo e Estabilidade

Para a determinação do pH ótimo, foi avaliado o tamponamento com maior taxa de hidrólise do substrato BApNA, os sistemas tampão escolhidos foram: acetato de sódio (pH 4-6); fosfato de sódio (pH 7,0); Tris-HCl (pH 8,0); glicina (pH 9-11) e $\text{Na}_2\text{HPO}_4/\text{NaOH}$ (pH 12-13), todos à concentração de 100 mM. Para o estudo foram

pipetados 20 μL de enzima purificada, 80 μL de solução reveladora (0,4 μL de BApNA + 79,6 μL dos respectivos tampões). Decorridos 30 min, as reações foram bloqueadas com a adição de 100 μL de ácido acético 20 % (m/v) e aferido o monitoramento das atividades com leituras a 410 nm. Em se tratando dos testes de estabilidade, a proteína isolada foi incubada por 60 min nos diferentes pHs, a temperatura de 50 °C (temperatura ótima). Após o tempo especificado, todas as frações foram submetidas a reação com o BApNA, e assim avaliado, por meio da intensidade da leitura (410 nm) a estabilidade dependente da variação de pH.

4.9 Teste de Temperatura Ótima e Estabilidade Térmica

A enzima isolada teve sua atividade avaliada em diferentes temperaturas, 20–70 °C, para especificar a temperatura ótima e estabilidade nas diferentes temperaturas. A determinação da temperatura ótima foi efetuada utilizando-se 20 μL da proteína purificada e 80 μL de solução reveladora (0,4 μL de BApNA + 59,6 μL de tampão glicina pH 9,0). Tal reação foi encubada por 30 min nas respectivas temperaturas, e interrompida com a adição de 100 μL de ácido cítrico. Para os testes de estabilidade, a proteína isolada foi incubada por 60 min nas diferentes temperaturas 20-70 °C. Após o tempo especificado, todas as frações foram submetidas a reação com o BApNA, e assim avaliado, por meio da intensidade da leitura (410 nm) a estabilidade em relação a temperatura.

4.10 Teste de Inibição

A ação catalítica da enzima purificada a partir do ceco-pilórico do Pacamã foi avaliada na presença de diferentes inibidores: Fluoreto de Fenilmetilsulfonil (PMSF) (1mM), 2-Mercaptoethanol (5mM) e Ácido Etilenodiaminotetracético (EDTA) (1mM). Nesta análise, a enzima foi incubada com os inibidores por 30 min a 25°C, procedendo o teste de atividade como descrito em 4.3. A reação sem a presença de inibidores foi tomada como 100% de atividade.

4.11 Estudo Cinéticos

Os estudos cinéticos da enzima Purificada foram efetuados durante 90 min a 50°C em diferentes concentrações do substrato BApNA (0 a 6,0 mM). As determinações foram tomadas de acordo com os parâmetros cinéticos, incluindo K_m e V_{max} . O k_{cat} foi calculado pela seguinte equação: $k_{cat} = V_{max}/[E]$, onde $[E]$ é a concentração de enzima total e V_{max} a sua velocidade máxima.

5 RESULTADOS E DISCUSSÕES

5.1 Precipitação Salina

Inicialmente, o extrato bruto foi submetido a precipitação salina com sulfato de amônio. As atividades correspondentes as frações de precipitação são mostrados na **Tabela 3**.

Tabela 3. Precipitação Salina: A_{410} das Frações de Precipitação Salina. O volume inicial de Extrato Bruto foi de 12 mL, e todas as precipitações foram processadas a 15,000g a 4°C por 10 min. Durante a adição do sal, o extrato enzimático foi mantido a temperatura de 4°C, e agitação constante.

Frações da Precipitação	A_{410} nm
Extrato Bruto	0,032
F1= 0-20 %	0,007
F2= 20-40 %	0,130
F3= 40-60%	0,334
F4= 60-80%	0,083
F5= 80-100 %	0,000

Fonte: elaborada pelo autor, 2016.

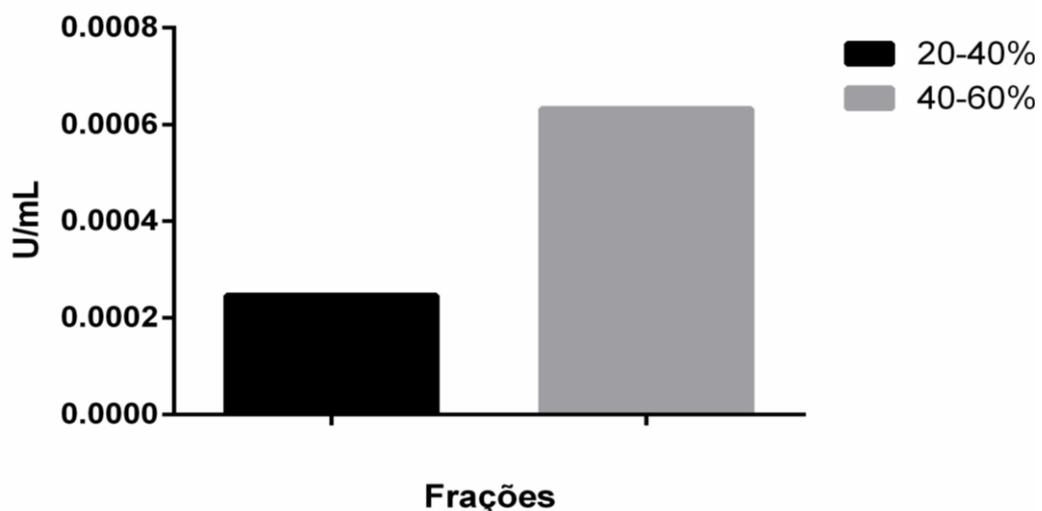
Na purificação, é de fundamental interesse que os contaminantes sejam minimizados e que o analito seja retirado do meio onde se encontra em maiores concentrações. Além do mais, é necessário que o método seja de uma boa resolução, fazendo com que a proteína estudada esteja inserida numa única fração. Tal comportamento pode ser atribuído a inúmeros fatores, dos quais se destacam o controle da agitação, que deve ser mantida numa velocidade constante, assim como o controle da temperatura, a qual deve ser a mesma para todas as etapas do processo (STRYER, TYMOZKO e BERG, 2006).

Segundo Mariam et al. (2015), a precipitação com sulfato de amônio é uma aproximação da cromatografia líquida relativamente pouco dispendiosa, que pode ser adotada na fase inicial da purificação, onde uma elevada recuperação do analito é normalmente obtida a partir deste método, antes mesmo das enzimas serem submetidas à purificação subsequente, e polimento para melhorar seu estado de pureza.

Tomando como parâmetro de determinação a reação enzimática com o substrato BApNA, verificou-se diferentes valores para cada um dos precipitados encontrados (0,031; 0,007; 0,130; 0,334, 0,083), e a única que não expressou resultado quantitativo foi a do sobrenadante final (80-100%). Isso, por sua vez,

testifica que todas as tripsinas existentes foram fracionadas nesta primeira etapa de refinamento, o que é muito importante, pois confirma a validade do método para a finalidade proposta (MAHN, 2011). Por outro lado, dentre as amostras que expressaram a reação de hidrólise, verifica-se que os precipitados 20-40 e 40-60 % de concentração salina, obtiveram os valores mais significativos, 0,130 e 0,334 respectivamente (**Figura 11**), os quais foram semelhantes aos estudos realizados com purificação de tripsina de espécies de peixe como: *Sepia officinalis*, *Colossoma macropomum* e *Macruronus novaezealandiae*, (BALTI, 2009; MARCUSCHI et al., 2010; SHI, MARSHALL e SIMPSON, 2007).

Figura 11. Atividade das frações de maiores valores obtidas por precipitação em sulfato de amônio: Ambas as reações foram mantidas por 30 min a 37°C. Para interrupção da reação foi adicionado ácido cítrico 20%(m/v). O monitoramento da hidrólise do substrato BApNA foi efetuado a 410 nm.



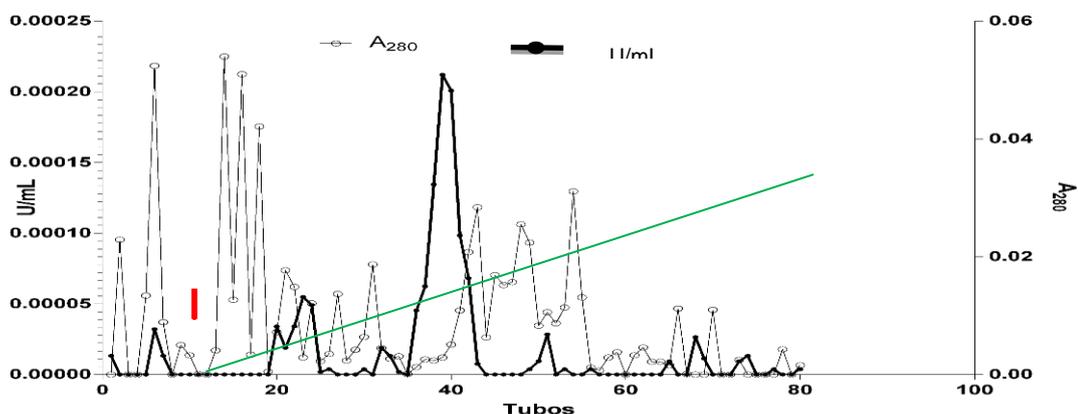
Fonte: elaborada pelo autor, 2016.

Entretanto, por a fração F3 (40-60%) ter sido a com maior atividade, atingindo aproximadamente três vezes mais atividade expressa que a 20-40%, optou-se em dar continuidade a purificação apenas com F3. Esse tipo de escolha traz consigo algumas implicações, onde se observa a redução de contaminantes proteicos, os quais assegurariam maior complexidade da amostra, e conseqüente dificultariam o processo de separação nas análises subsequentes. .

5.2 Cromatografia (DEAE-Sepharose)

O cromatograma obtido, mostrado esquematicamente na **Figura 12** revela que antes do gradiente salino ser iniciado (seta vermelha), parte das proteínas foram eluídas. Isso, por sua vez, é atribuído a ausência de interações adsorptivas entre a fase sólida e algumas das proteínas existentes na amostra aplicada (SHI, MARSHALL e SIMPSON, 2007; KIM e JEONG, 2013, KHALED et al., 2011). Por outro lado, através da eluição, 0-100% de B (Linha verde), observa-se uma resolução bem significativa, onde as demais proteínas são desprendidas em diferentes momentos ao longo da corrida cromatográfica. Esse tipo de resolução é de grande importância pra quem deseja purificar proteínas por cromatografia líquida, pois é através dele que se consegue dimensionar, ainda que de forma qualitativa, o perfil da amostra de estudo, tanto em relação a complexidade estrutural, como a características química das mesmas. A resina utilizada, DEAE-Sepharose, cujos grupos carregados são moléculas de dietilaminoetil, confere ampla estabilidade, frente as condições estabelecidas no experimento, como fluxo de eluição, pH e concentração salina (SIGMA-ALDRICH, 2016), tornando o método extremamente efetivo, e de resolução bastante pronunciada. Em conformidade ao perfil de eluição alcançado neste trabalho, citam-se os estudos de He e Rosazza (2003); Fukunaga et al., (2006) e Darkoh, Kaplan e Dupont (2011), que utilizaram a mesma coluna cromatográfica (DEAE-Sepharose).

Figura 12. Cromatograma (DEAE-Sepharose): (A₂₈₀) Perfil de Eluição da tripsina purificada (linha pontilhada). Atividade enzimática em U/mL (linha preta). A coluna foi previamente equilibrada com o Tampão (A) 50mM Tris-HCl pH 8,0. Para dessorver as proteínas aderidas foi usado o tampão de eluição (B) 50 mM Tris –HCl pH 8,0 + 0,5 M de NaCl. A eluição foi feita em 40 volumes de coluna e o volume coletado para cada fração foi de (5.0 mL) a um fluxo de 0,5 ml/min.



Por se tratar de um material de grande complexidade proteica, a única forma de diagnosticar o momento de eluição da tripsina era através de ensaios com BApNA, monitorando a reação em todos os tubos coletados. A análise da **Figura 12** confirma também a presença de diferentes tripsinas (isoformas), sendo que a correspondente aos tubos (37-42) foi a que revelou maior atividade específica (curva indicada em U/mL). Foi observado que cada isoforma assume propriedade química muito particular, isto é confirmado pelo fato dos perfis de eluição ser bastante diferenciado entre elas. Esse tipo de complexidade é de certa forma particular a cada espécie, e como discorrido anteriormente, proporcional também a composição nutricional dos alimentos ingeridos pelos peixes.

Vale também salientar que a causa das outras tripsinas terem taxas de hidrólise em menor proporção, pode estar correlacionada as condições de reação submetidas, como temperatura e pH. Assim, nada impede que alterando estas variantes, os resultados expressos tenham perfis também diversificados. Contrariando os resultados obtidos neste trabalho, estudos com os peixes *Paralichthys olivaceus* (KIN, e JEONG, 2011), *Salaria basilisca* (KTARI et al., 2012), *Pterygoplichthys disjunctivus* (VILLALBA-VILLALBA et al., 2013), *Caranx hippos* (COSTA et al., 2013) identificaram um único pico de atividade, referente a hidrólise enzimática promovida pela tripsina purificada. Por outro lado, de *Sardinella aurita* (KHALED et al., 2011) foi possível observar a existência de duas ou mais isoformas, bastante semelhante ao cromatograma do *L. alexandri*.

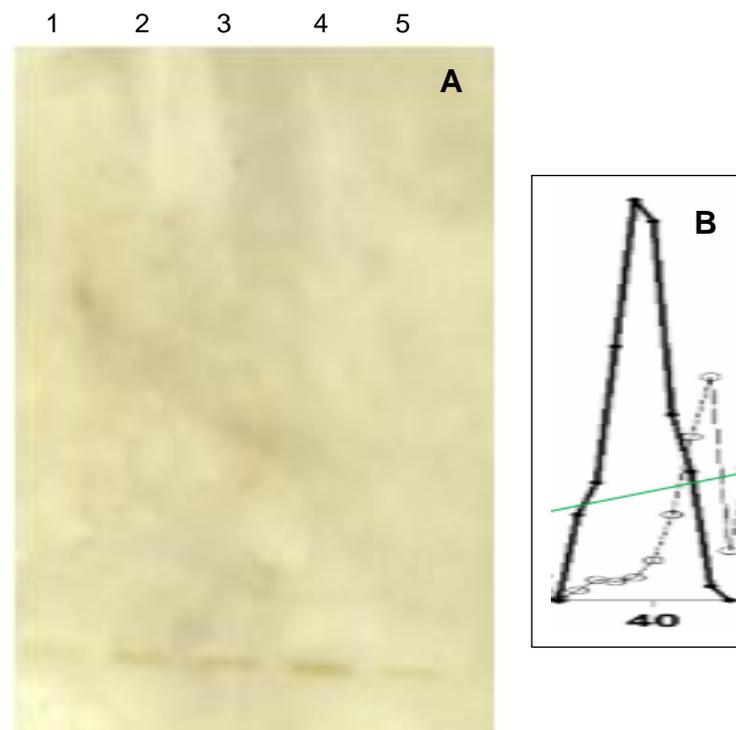
Outro importante dado aferido na cromatografia do *L. alexandri* está associado ao momento de eluição da enzima de maior atividade expressa (Tubos 37-41), que se deu na área de máxima resolução, o centro do gradiente salino. O que confirma uma boa interação adsortiva com os grupos dietilaminoetil presentes na resina. Assim, isso pode favorecer uma boa separação entre a tripsina e outras moléculas com propriedades elétricas semelhantes. Para avaliar a efetividade na purificação foi feito um SDS-PAGE, visando a observação de bandas nas frações com atividade, e consequentemente validar a homogeneidade das amostras.

5.3 Eletroforese SDS-PAGE

As máximas atividades enzimáticas estiveram inseridas entre as frações 37-40, assim, optou-se em avaliar apenas estas amostras, desenvolvendo um estudo

qualitativo de todo o pico, de forma a validar se a estratégia proposta fora realmente efetiva na purificação da tripsina. Os resultados expressos na **(Figura 13-A)**, mostram nas canaletas 1-5 uma única banda proteica, e cuja concentração no gel segue de modo único, o pico de atividade correspondente **(Figura 13-B)**. Isto por sua vez, reforça a inteira homogeneidade da amostra nos respectivos tubos avaliados, visto que a metodologia desenvolvida para corar as proteínas (Nitrato de Prata) é bem mais sensível, quando comparado com o de Comassie (BLUM et al., 1987). A determinação de proteínas usando o corante Comassie Brilliant Blue se dá por meio de interação eletrostática com os grupamentos amino de peptídeos e proteínas, permitindo a detecção de até $0,5\mu\text{g}/\text{cm}^2$ de produto no gel (SYROVY e HODNY, 1991), enquanto que nitrato alcança limites de detecção de 0,5-5ng.

Figura 13. (A) Eletroforese SDS- PAGE a 12%. As linhas 1-5 correspondem as frações 37-41. A eletroforese foi processada a voltagem constante (90 mV), e as bandas coradas com nitrato de prata. (B) Atividade das frações exportada do cromatograma.



Fonte: elaborada pelo autor, 2016

Com a finalidade de comparar a evolução da purificação entre as etapas subsequentes, fez-se outra eletroforese (SDS-PAGE) desta vez a 15% **(Figura 14)**. O gel a 15% possui uma maior “rigidez”, ao ser comparado com o anteriormente mostrado na **Figura 13**. Tal característica possibilita uma análise mais precisa, pelo fato da eluição ser retardada na eletroforese, e conseqüentemente, visualizar a

enzima em uma região de maior confiabilidade (parte interna do gel). Na canaleta 1 foi aplicado o padrão de massa. Nas canaletas 2 e 3 o extrato bruto e a fração de precipitação salina, respectivamente. A coloração visualizada, referente a presença de proteínas, é inteiramente associada a concentração das mesmas. Logo, o fato do extrato bruto (EB) estar menos marcado, quando comparado com a amostra da precipitação salina (40-60%) é decorrência de seriadas diluições feitas com o EB, durante os estudos feitos destinados a caracterização enzimática. Por outro lado, a proteína completamente isolada após a única cromatografia (DEAE-Sepharose) é mostrada na canaleta 4. Assim, com essa análise é possível confirmar com tamanha precisão a efetividade da estratégia de purificação, em que é visto uma única banda corada com prata.

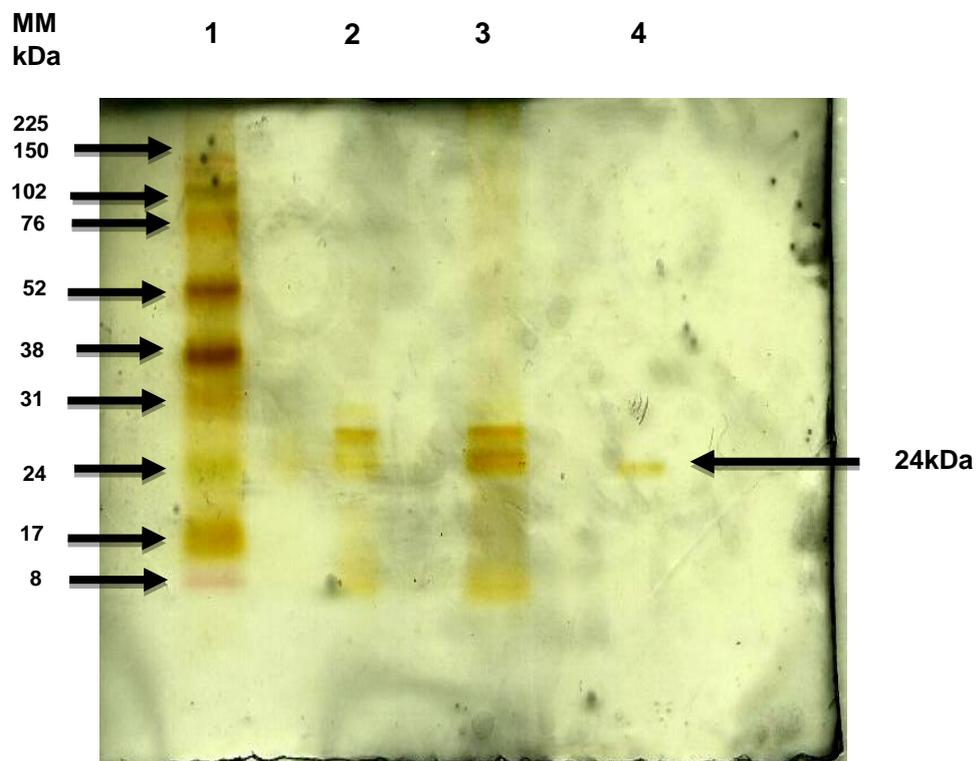
O êxito em purificar uma enzima, com tamanha garantia em eficiência, e acima de tudo, partindo-se de apenas uma rota cromatográfica é algo pouco visto, quando comparado com trabalhos relacionados. Jellouli et al. (2009); Marcuschi et al. (2010); Cai et al. (2011); Sriket et al. (2012) e Villalba-Villalba (2013), os quais estudando estratégias de purificação de tripsina a partir das vísceras de peixes, tiveram em conformidade o uso de duas ou mais cromatografias líquidas (colunas de afinidade, gel filtração e troca iônica).

São muitas as variáveis levadas em consideração para que se consiga tamanha eficiência experimental, como volume da coluna, fluxo adequado para eluição, e escolha ótima dos tampões a ser utilizado, pois garante que os grupos carregados adsorvidos na matriz de agarose (dietilaminoetil) estejam em condições íntegras, favorecendo assim a interação com as proteínas. Para a indústria, isso é de grande valia, pois se trata de uma técnica economicamente acessível, uma vez que a resina possui um preço inferior, comparado a outras resinas de alta resolução, grande estabilidade (podendo ser reutilizada) (SIGMA-ALDRICH, 2016).

A recuperação também é bastante beneficiada em experimentos dessa natureza, pois metodologias com dois ou mais processos cromatográficos tendem a obter ao fim da análise, baixos níveis de recuperação. Tomando uma avaliação aproximada do nível de recuperação em função dos processos submetidos, verifica-se que Freitas et al. (2012) (*Arapaima gigas*) obteve um valor de 17%; Nasri et al. (2012) (*Zosterisessor ophiocephalus*) obtiveram 20% de recuperação e Khantaphant e Benjakul (2010) (*Lutjanus vitta*) valor próximo a 5%. Ambos os estudos com tripsina de espécies aquáticas.

Por outro lado, com a rota desenvolvida neste trabalho foi possível purificar a tripsina com um nível de recuperação avaliado em 45%, visivelmente superior a demais estudos correlacionados (**Tabela 4**). Confirmando ainda mais, a precisão e objetividade do método, que poderá facilmente ser exportado à níveis industriais, e com uma metodologia de baixo custo (KHANGEMBAM, 2015).

Figura 14. SDS-PAGE (15%) da Tripsina Purificada: SDS-PAGE da tripsina purificada a partir do ceco-pilórico do Pacamã (*Luphiosilurus alexandri*). Linha 1: Padrão de massa; Linha 2: Extrato bruto; Linha 3: fração de precipitação salina (40-60); Linha 4: enzima purificada correspondente aos tubos 37-42 reunidos. A eletroforese foi processada a voltagem constante (90 mV), e as bandas foram coradas com nitrato de prata.



Fonte: elaborada pelo autor, 2016

A massa molecular da tripsina do *L. alexandri* (24kDa) é similar à tripsinas purificadas de outras espécies de peixes, como os *P. setiferus* (GATES e TREVIS, 1969), (KISHIMURA, et al., 2008), *S. melanostictus* e *Pleuroprammus azonus* (KISHIMURA et al., 2006), *Sebastes schlegelii* e *Alcichthys alcicornis* (KISHIMURA et al., 2007), *T. albacores*, *K. pelamis* (KLOMKAO et al., 2007) e *S. pilchardus* (BOUGATEF et al., 2007). Essa característica é muito comum para essa classe de enzimas, incluindo as purificadas de outros seres vivos, como exemplo os insetos, cujas massas computadas variam de 20-30 KDa (REIS, 2009).

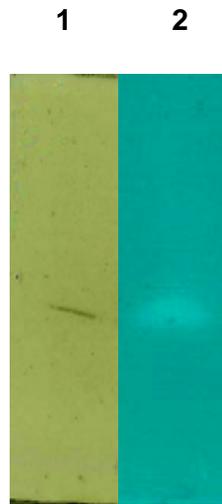
5.4 Eletroforese Nativa e Zimograma

A análise da **Figura 15** mostra que a eletroforese nativa confirmou apenas uma banda para a tripsina purificada, o que corrobora a constituição de uma única subunidade polipeptídica (canaleta 1), já que em condições desnaturantes o mesmo fora também observado. Além disso, comprova-se que existe atividade proteolítica correspondente a banda mostrada na eletroforese nativa, devido a incidência de uma banda clara no gel polimerizado com caseína (canaleta 2). Esse resultado revela mais uma importante característica da tripsina do Pacamã, que é manutenção de sua atividade após ter sido imobilizada a uma matriz sólida.

Tal ação se dá por intermédio da manutenção das enzimas em sistemas enzimáticos fisicamente confinados, ou confinados em um suporte com retenção de sua atividade hidrolítica. Podendo ser aplicado de forma contínua, e repetidas vezes (SILVA, 2013). Esse tipo de imobilização pode ser destinado tanto a transformação da enzima, de modo a torná-la insolúvel em meio aquoso, como também o seu uso na forma solúvel, quando presentes em reatores com membranas de ultra filtração, que permite a passagem dos produtos da hidrólise, mas restringe a mobilidade das enzimas (ZANIN e MORAIS, 2004).

As formas com que as moléculas de atividade catalítica são imobilizadas nos suportes inertes são bastante diversificadas, podendo ser de natureza adsortiva, ligações covalentes, ligações covalentes cruzadas com reagente multifuncional, e o encapsulamento da molécula em um gel ou membrana (SILVA, 2013). Cada um deles, é claro, com aplicabilidade proporcional ao estudo que se pretende desempenhar, bem como as condições bioquímicas que a molécula vai ser submetida. Como exemplo, cita-se a atividade hidrolítica de proteínas do soro láctico por meio da ação de tripsinas e quimotripsinas imobilizadas em suportes sólidos (GALVÃO, 2004)

Figura 15. Eletroforese Nativa e Zimograma: Linha 1: eletroforese nativa para tripsina purificada. Após eletroforese, a enzima foi corada com nitrato de prata. Linha 2: zimograma com caseína polimerizada ao gel a 0.2%. Após eletroforese, o gel foi lavado com Triton X-100 2,5% por 30 min, em seguida, encubado em 50 mM Tris HCl pH 8,0 por 48h a temperatura ambiente.



Fonte: elaborada pelo autor, 2016

A tripsina foi extraída e purificada a partir do ceco-pilórico do Pacamã (*Lophiosilurus alexandri*) com apenas duas etapas de purificação. O resumo da purificação é mostrada na **Tabela 4**. Em ambas as etapas proposta: precipitação salina, e cromatografia líquida, o nível de recuperação obtido fora de 87 e 45% respectivamente. Todos eles bem acima dos valores alcançados em trabalhos com outros peixes, como *Arapaima gigas* (Freitas et al., 2012); *Zosterisessor ophiocephalus* (NASRI et al., 2012) e *Lutjanus vitta* (KHANTAPHANT e BENJAKUL, 2010). Esse efeito traz também como reflexo adicional a significativa estabilidade da molécula perante os procedimentos realizados, como a exposição a diferentes ambientes térmicos, visto que a cada intervalo experimental, as amostras eram estocadas na geladeira a 4°C, e posteriormente retiradas, para a continuidade dos experimentos, assim como o extenso intervalo de tempo, desde a trituração das vísceras até os estudos cinéticos, e por fim, a estabilidade perante os sais: NaCl e sulfato de amônio.

Tabela 4: Resumo de purificação da Tripsina a partir do Pacamã (*Lophiosilurus alexandri*)

Etapas de purificação	Atividade total (U)	Proteína total (mg)	Atividade Específica (U/mg)	Recuperação (%)
Extrato Bruto	481,81	229,9	2,09	100
40-60 % (NH ₄) ₂ SO ₄)	416,66	118,64	3,51	86,97
DEAE 1 (37-42)	232,95	31,43	7,42	44,91

Fonte: elaborada pelo autor, 2016

5.5 Caracterização Enzimática

5.5.1 Efeito do pH

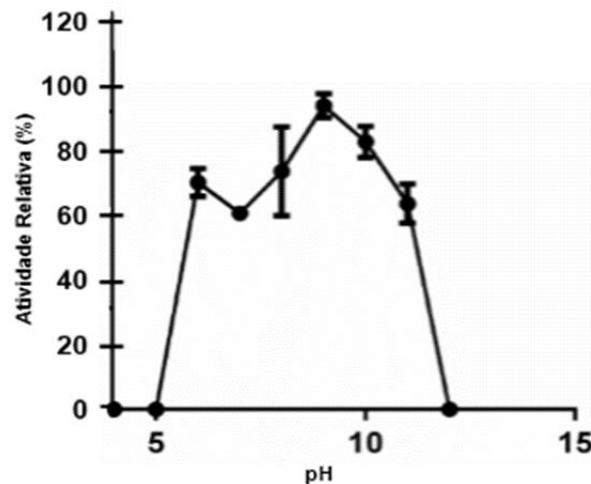
Na **Figura 16**, verifica-se que em pH 4,0 e 5,0 não houve atividade expressiva para a tripsina purificada, fato esse atribuído a provável desnaturação da molécula em meio ácido. A desnaturação enzimática é o termo usado para qualquer alteração estrutural promovida na enzima, a qual impede que a molécula realize sua função catalítica anteriormente desempenhada. Conforme discutido em seções anteriores, a atividade da tripsina tem como característica a participação da tríade catalítica dos seguintes aminoácidos: Serina, Histidina e o Ácido aspártico. Uma das etapas primordiais no mecanismo catalítico está associado à ação do aminoácido histidina como uma base de Lewis, abstraindo o próton do resíduo de serina. Assim, em condições ácidas (pHs 4,0 e 5,0) o resíduo de histidina se mostra na sua forma protonada, impossibilitando assim o ataque nucleofílico ao próton ligado a hidroxila da serina, e conseqüentemente inibindo a reação de hidrólise. Por outro lado, entre os valores (6,0-11,0), constata-se altos níveis de catálise, sendo que o maior deles, correspondente ao pH ótimo, foi em pH 9,0. Este efeito é também facilmente compreendido pelo estudo mecanístico da tríade catalítica, uma vez que a partir do pH 6,0 o resíduo de histidina começa a sofrer a desprotonação do hidrogênio ligado ao nitrogênio interno do anel (pK_R da histidina é 6,0). Tal informação é bastante coerente, pois o ambiente fisiológico onde estas moléculas são ativas é de natureza alcalina. Além disso, corrobora com a atividade ótima aferida a esse pH para a tripsina extraída do ceco-pilórico do *Siniperca chuatsi* (LU et al., 2008).

Por outro lado, ao passo que o pH foi elevado, 10 -12, a atividade enzimática decaiu drasticamente, corroborando assim mais uma ação desnaturante desencadeado pelo pH, desta vez em condições alcalinas.

Enquanto que nos pHs 4,0 e 5,0 o aminoácido mais atuante no comportamento inibitório da tripsina era o resíduo de histidina, no meio alcalino (pH: 10 -12) verifica-se a alteração estrutural em todos os resíduos da tríade, assim como os outros que compõem a proteína, pois nestas condições, boa parte dos grupos ionizáveis começam a ser dissociados, a partir do pH 10, e em pH 12, todos os aminoácidos se mostram desprotonados, conferindo a molécula uma perturbação

estrutural desencadeada pelo excesso de cargas negativas distribuídas ao longo da mesma.

Figura 16. Curva de pH Ótimo. Os ensaios enzimáticos foram realizados com o substrato BApNA em pHs 4,0 a 12,0. Para detecção do pH ótimo, as enzimas foram encubadas a 37°C, e a atividade máxima obtida em pH 9,0 foi considerada como 100%.

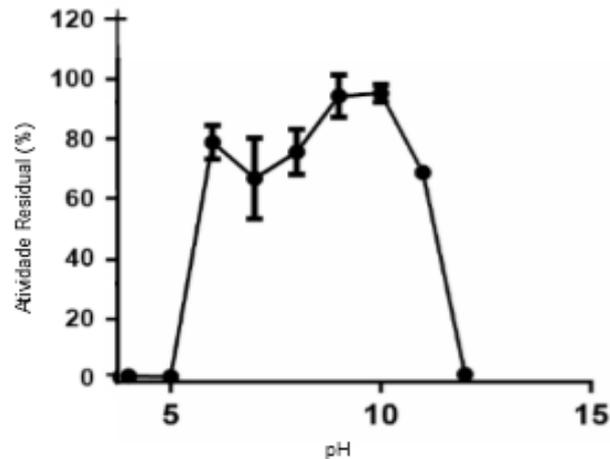


Fonte: elaborada pelo autor, 2016

O fato da enzima ter uma ampla faixa de atividade, pH 6,0 a 11, é importante para variadas aplicações biotecnológicas. Um dos critérios primordiais a ser levado em consideração para a utilização de enzimas digestivas no processamento de detergentes é a sua atividade em meio alcalino (MAURER, 2004). Assim, testifica-se que a tripsina purificada do *Lophiosilurus alexandri* possui grande potencialidade em ser usada na produção de detergentes.

Diferentemente de outros trabalhos realizados com *Siniperca chuatsi* (LU et al., 2008), *Pterygoplichthys disjunctivus* (VILLALBA et al., 2013), *Salaria basilisca* (KTARI et al., 2012), *Sepia officinalis* (BALTI et al., 2009) e *Cirrhinus mrigala* (KHANGEMBRAM e CHAKRABARTI, 2014), a estabilidade da tripsina do Pacamã nos diferentes valores de pH mostrou comportamento bem adverso, sem um perfil hiperbólico normalmente visualizados em estudos cinéticos com essas moléculas. Isso configura uma particularidade comportamental da tripsina do *L. alexandri* na condições reacionais submetidas. Conforme pode ser visto na **Figura 17**.

Figura 17. Estabilidade em pH: Os ensaios enzimáticos foram realizados com o substrato BApNA em diferentes pHs (4,0 e 12,0). O teste de estabilidade foi realizado a 50°C. A atividade máxima obtida em pH 9,0 foi considerada como 100%.



Fonte: elaborada pelo autor, 2016

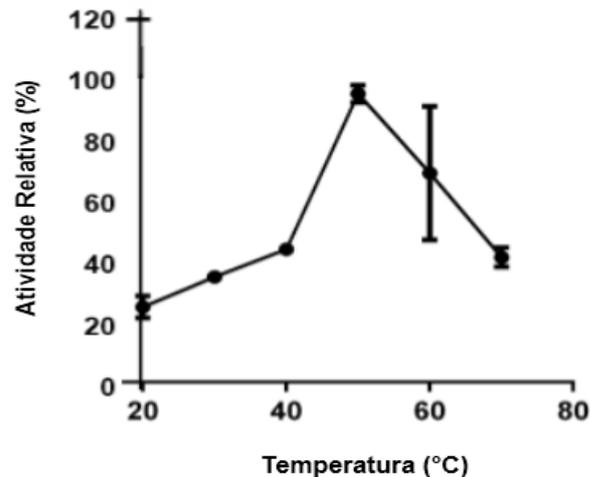
5.5.2 Efeito da temperatura

Da mesma forma que o pH conseguiu desempenhar mecanismo de hidrólise diferenciado para a tripsina do *L. alexandri*, a temperatura também possibilita diferentes efeitos, tanto no beneficiamento, como para a depleção da estrutura nativa. Apesar de ser uma molécula isolada a partir de um peixe, de ambientes térmicos ameno, a tripsina do Pacamã expressou temperatura ótima de hidrólise a 50°C (**Figura 18**). Isto por sua vez está diretamente relacionado ao grau de liberdade de todos os átomos existentes na estrutura proteica. Aqui, não há a constatação de dissociação de espécies químicas, conforme visualizado no estudo de pH, mas apenas ao nível de agitação estrutural que a proteína se encontra.

Ao passo que se eleva a temperatura, o estado cinético dos átomos aumenta, desencadeando vibrações e rotações desproporcionais ao longo das ligações covalentes, e em decorrência, possibilita o afastamento de átomos, ou mesmo a aproximação indesejada dos mesmos. Em ambos os casos, a molécula perde a sua conformação nativa, atingindo níveis energeticamente desfavoráveis, e como resultado, alterando a reação anteriormente desempenhada. O mesmo perfil de hidrólise foi encontrado em: *Eleginus gracilis* (FUCHISE et al., 2009); *Colossoma macropomum* (MARCUSCHI et al., 2010) e *Sardinella aurita* (KHALED, 2011), onde confirmaram a atividade ótima para tripsinas purificadas em 50 °C. Por outro lado, Balti et al. (2009) e Ktari et al. (2012) avaliaram a atividade ótima do *Sepia officinalis*

e *Salaria basilisca* acima de 70 °C, respectivamente. Normalmente a estabilidade da enzima frente a altas temperaturas pode estar associada a presença de pontes dissulfeto, a qual confere maior rigidez à molécula, quando submetida situações de maior agitação cinética.

Figura 18. Temperatura ótima: A atividade da enzima foi avaliada em diferentes temperaturas, tendo o BApNA como substrato. As reações foram efetuadas em pH 9,0 e a atividade máxima correspondente a 50°C foi atribuída como 100%.

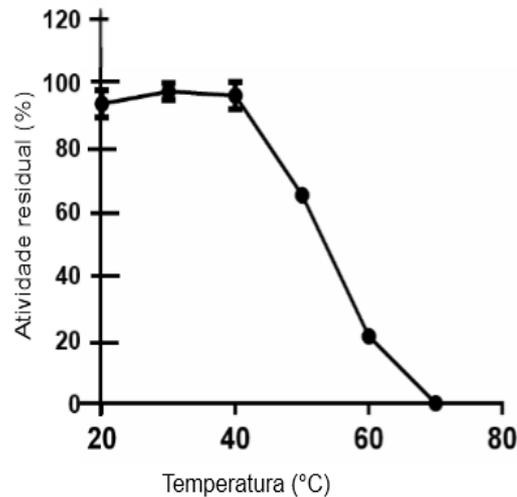


Fonte: elaborada pelo autor, 2016

Na **Figura 19** tem-se a estabilidade térmica da enzima após 60 mim de incubação nas diferentes temperaturas, 20-70 °C. Observa-se que acima de 40°C, a atividade específica é reduzida de forma bem drástica, e chega a zerar em 70°C. Esse comportamento, por sua vez, é causado pela desnaturação da molécula a medida que a temperatura é elevada. Contrapondo esses resultados com outros trabalhos relacionados, percebe-se uma similaridade entre a tripsina purificada do *S. officinalis* (BALTI, et al., 2009) e *Cirrhinus mrigala* (KHANGEMBAM e CHAKRABARTI, 2015).

Desta forma, a tripsina do Pacamã representa uma promissora proposta de aplicação no processamento de produtos alimentícios, principalmente aqueles relacionados a produção de leites e seus derivados (BREWER, HELBING, HELBIG E HAARD, 1984), os quais são efetuados a baixas temperaturas.

Figura 19. Estabilidade térmica: A atividade da enzima foi avaliada em diferentes temperaturas, tendo o BApNA como substrato. As reações foram efetuadas em pH 9,0 e a atividade máxima correspondente a 50°C foi atribuída como 100%.



Fonte: elaborada pelo autor, 2016

5.5.3 Efeito de inibidores

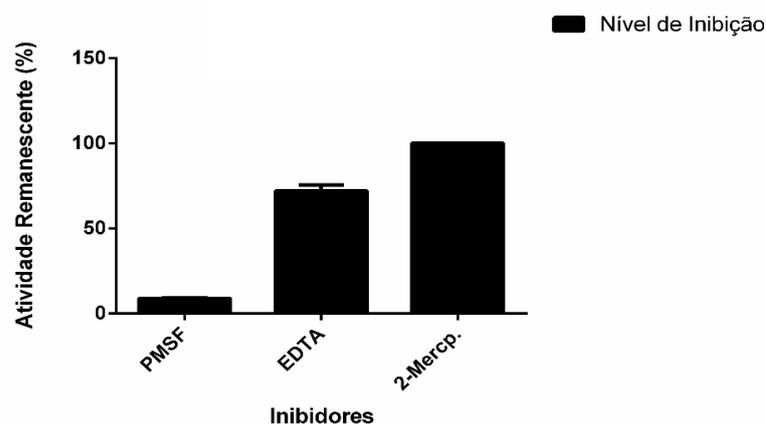
As enzimas assumem diferentes classificações, e estas, por sua vez, são identificadas de acordo com a natureza bioquímica da reação catalisada. Uma das formas aceitas em se comprovar a classificação é através do uso de ensaios com inibidores conhecidos. Para a tripsina purificada do *L. alexandri* foram usados três diferentes inibidores: PMSF, inibidor de serinoproteases, EDTA, inibidor de metalproteases, e por fim, 2-Mercaptoetanol, inibidor de Tiol-proteases.

A análise da **Figura 20** mostra que o 2-Mercaptoetanol não conseguiu modificar a taxa de hidrólise do substrato, mesmo quando a proteína foi submetida a prévia incubação com o suposto inibidor. Por outro lado, em presença de PMSF, a atividade enzimática foi decrescida quase que por completo (90%). A mesma figura ainda mostra que o EDTA desencadeou uma redução na atividade, cerca de 25%. Esse tipo de comportamento foi também relatado por Ktari (2012), Silva (2011), em trabalhos com peixe, o que pode estar atrelado a provável dependência da molécula a íons metálicos por parte da tripsina, principalmente íons cálcio.

Na realidade, o mecanismo definitivo que associa a participação do cálcio na reação e estabilidade de tripsinas é algo ainda em estudo. Não há o perfeito entendimento se os íons agem no processo de hidrólise, ou se a sua contribuição na estabilidade da enzima é decorrente da manutenção da estrutura terciária da molécula.

O perfil estrutural, assim como a especificidade de hidrólise para substratos comerciais são muito comuns para tripsinas, sejam aquelas purificadas de mamíferos terrestres, insetos, ou mesmo de espécies aquáticas. Entretanto, a sua dependência ao Ca^{2+} é inteiramente ambígua, sem muita correlação, visto nos insetos a sua presença não ser de fundamental exigência para que a enzima mantenha a atividade (REIS, 2009), diferentemente dos mamíferos, onde a retirada de Ca^{2+} induz o decréscimo no nível de hidrólise desempenhada pela tripsina (LOPES, et al., 2006).

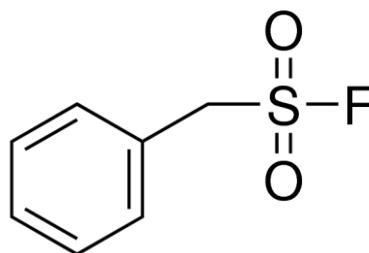
Figura 20. Teste de Inibição: A enzima purificada foi encubada por 30 min a 25°C com diferentes inibidores: PMSF (1 mM); EDTA (1 mM) e 2-Mercaptoetanol (5 mM). A atividade remanescente foi avaliada em pH 8,0 a 37°C por 7 h. A atividade da enzima medida sem a presença do inibidor foi tomada como 100%.



Fonte: elaborada pelo autor, 2016.

Conforme discutido na seção 2.6.2, o sítio catalítico da tripsina possui um aminoácido serina, cuja cadeia lateral promove um ataque nucleofílico no inibidor PMSF **Figura 21**.

Figura 21. Fenilmetilsulfonil (PMSF)



Fonte: elaborada pelo autor, 2016.

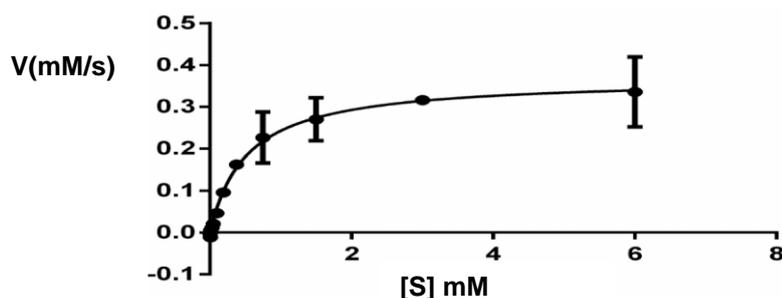
Tal molécula tem como característica um átomo de flúor eletronegativo ligado ao átomo de enxofre, e ao sofrer a hidrólise pela tripsina, forma um composto tetraédrico relativamente estável, mimetizando assim, o intermediário tetraédrico da reação das serinoproteases. Assim, através dos ensaios de inibição submetidos pode-se concluir que a proteína purificada enquadra-se entre a família das serinoproteases.

5.5.4 Propriedades cinéticas

Reações enzimáticas possuem como parâmetro central a capacidade destas moléculas catalisarem reações químicas. Durante o processo de reação, o substrato se liga à enzima em orientação adequada, fazendo com que o complexo enzima substrato seja formado. Nesse tipo de encaixe complementar, algumas interações não covalentes ocorrem, do tipo ligação de hidrogênio, interações hidrofóbicas e interações iônicas. Como consequência, a energia livre (energia de ligação) liberada pela formação dessas interações compensa parcialmente a energia necessária para que as reações ocorram (COX, DOUDNA e O'DONNELL, 2012).

Uma importante estratégia de determinação da eficiência catalítica de uma enzima é a sua velocidade de reação, bem como a forma como essa é perturbada mediante modificações na concentração do substrato. O efeito da concentração deste na velocidade da reação catalisada pela tripsina purificada do *L. alexandri* foi determinado utilizando o substrato BAPNA, conforme descrito no item 4.11. Todo o procedimento seguiu o modelo cinético de Michaelis-Menten nas concentrações testadas, e os dados obtidos são mostrados na **Figura 22**.

Figura 22: Gráfico de Michaelis–Menten para a tripsina purificada do *L. alexandri* em diferentes concentrações do substrato BAPNA (0.0015–6.0 mM); concentração da enzima: 0,073 mg/mL; tampão: 100 mM Glicina/NaOH, 50 ° (y = Vmax[x]/Km + [x]); R2 = 0.9524.



Fonte: elaborada pelo autor, 2016.

Na **Tabela 5** tem-se em comparação com outros estudos o K_m , assim como demais constantes cinéticas da tripsina purificada do Pacamã. O valor de K_m , conforme mostrado, varia bastante de uma enzima para outra, assim como em diferentes temperaturas. Através do estudo comparativo da tabela percebe-se que a tripsina purificada do pacamã apresentou um valor de K_m bastante semelhante ao observado em *E. encrasicholus* e *L. vitta*, sendo também considerada com boa afinidade pelo substrato BApNA.

O termo V_{max} (**Figura 22**) depende tanto da concentração da enzima quanto da velocidade da etapa limitante da reação. Pelo o fato do número de etapas de reação, e a identificação da etapa limitante ser muito variado, é útil que se defina a **constante catalítica global**, K_{cat} , para descrever a etapa limitante de uma enzima quando esta atinge à saturação. Em situações onde a reação se processa com múltiplas etapas, sendo uma nitidamente limitante, o valor de K_{cat} equivale à constante de velocidade para a etapa limitante, expressando assim, o número de moléculas de substrato que estão sendo convertidos em produtos por uma única enzima a cada segundo.

O valor de k_{cat} da tripsina do pacamã teve valores de conversão superior a todas as tripsinas mostradas na **Tabela 5**, demonstrando uma alta eficiência catalítica comparada a demais tripsinas. Tal efeito traz como reflexo a possibilidade de se exportar o seu uso diferentes fins industriais, preferencialmente aqueles associados aos ambientes fisicoquímicos já relatados neste trabalho, como temperaturas moderadamente elevadas, assim como em ambientes alcalinos. Embora seja uma análise bastante efetiva em validar à especificidade de um catalizador biológico frente ao seu substrato, o k_{cat} é normalmente associado a condições de elevada concentração de substrato, em comparação à concentração enzimática, de forma que dificilmente se conseguiria alcançar esse perfil em condições fisiológicas. Assim, como estratégia comparativa da efetividade reacional em ambientes fisiológicos, foi criado a expressão k_{cat}/K_m (constante de especificidade), onde a velocidade de hidrólise, por exemplo, está diretamente relacionada à concentração das duas espécies envolvidas, [enzima] e [substrato].

Para a tripsina do *L. alexandri*, a constante de especificidade para o substrato BApNA foi de 9,67, valor bem inferior aos demais relatados na tabela. Entretanto, o uso desta molécula ainda é de suma relevância, visto ter atingido o máximo nível de

precessividade pelo substrato escolhido, o que para a indústria, independentemente do produto comercializado é de grande importância.

Tabela 5: Constantes Cinéticas

Trypsin	Km (mM)	kcat (s ⁻¹)	kcat/Km (s ⁻¹ mM ⁻¹)	Temp ótima (°C)	Reference
L. alexandri	0,517	5.0	9.67	50	Nosso Estudo
P. disjunctivus	0.13	1.46	11.24	25	Villalba et al (2011)
S. aurita A	0.13	2.24	17.92	25	Khaled et al. (2011)
B. capriscus	0.07	2.76	40.6	25	Jellouli et al. (2009)
S. officinalis	0.06	2.32	36.3	25	Balti, et al., (2009)
E. encrasicholus	0.66	3.2	4.84	25	Martinez et al. (1988)
G. morhua	0.077	4	51.9	25	Asgeirsson et al., (1989)
S. S. caerulea	0.051	2.12	41	25	Castillo et al. (2005)
L. vitta	0.507	4.71	9.27	30	Khantaphant, (2010)
E. japonica	0.049	1.55	31	45	Heu et al. (1995)
P. macracanthus	0.312	1.06	3.5	55	Hau and Benjakul (2006)

Fonte: elaborada pelo autor, 2016

6 CONCLUSÃO

Com o estudo proposto foi possível purificar e caracterizar a tripsina termoestável a partir do ceco-pilórico do Pacamã *Luphiosilurus alexandri* com apenas dois processos de purificação. A enzima purificada mostrou alta atividade entre pHs 6,0-11,0, bem como entre 20-60 °C, sendo por isso, considerada uma boa proposta à ser utilizada em indústrias voltadas a produção de detergentes e no processamentos de leite e seus derivados. Com relação aos estudos bioquímicos realizados, verificou-se que a mesma é pertencente à família das serinoproteases, manteve taxa de hidrólise após imobilização em suporte sólido, e suas constantes cinéticas k_m e k_{cat} para o BApNA foram 0.517 e 5,0 respectivamente.

REFERÊNCIAS

- ÁGEIRSSON, B. et al. Purification and characterization of trypsin from the poikilotherm *Gadus morhua*. **European journal of biochemistry**, v. 180, n. 1, p. 85-94, 1989.
- AUGUSTO, C.V. et al. Giant Amazonian fish pirarucu (*Arapaima gigas*): its viscera as a source of thermostable trypsin. **Food chemistry**, v. 133, n. 4, p. 1596-1602, 2012.
- BALDISSEROTTO, Bernardo. **Fisiologia de peixes aplicada à piscicultura**. Santa Maria, SC, Brazil: UFSM, 2002.
- BALTI, et al. Heatstable trypsin from cuttlefish (*Sepia officinalis*) hepatopancreas: Purification and characterization. **Food Chemistry**, V. 113, p. 146–154. 2009
- BAJAJ, Priyanka et al. Expression and purification of biologically active recombinant human paraoxonase 1 from inclusion bodies of *Escherichia coli*. **Protein expression and purification**, v. 115, p. 95-101, 2015.
- BERNARDI, L. S. et al. Enzymatic modification of soy protein concentrates by fungal and bacterial proteases. **Journal of the American Oil Chemists Society**, v. 68, n. 2, p. 102-105, 1991.
- BEZERRA, R. S. et al. Partial purification and characterization of a thermostable trypsin from pyloric caeca of tambaqui (*Colossoma macropomum*). **Journal of Food Biochemistry**, v. 25, n. 3, p. 199-210, 2001.
- BEZERRA, Ranilson S. et al. Alkaline proteinase from intestine of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). **Process Biochemistry**, v. 40, n. 5, p. 1829-1834, 2005.
- BIESALSKI, Hans-Konrad et al. Bioactive compounds: Safety and efficacy. **Nutrition**, v. 25, n. 11, p. 1206-1211, 2009.
- BIO RAD. Disponível em < http://www.bio-rad.com/pt-br/category/cation-exchange-resin?pcp_loc=Inav > Acesso em Janeiro de 2016.
- BKHAIRIA, Intidhar et al. Biochemical and molecular characterisation of a new alkaline trypsin from *Liza aurata*: Structural features explaining thermal stability. **Food chemistry**, v. 196, p. 1346-1354, 2016.
- BLUM, H.; BEIER, H.; GROSS, H. J. Improved silver staining of plants proteins RNA and DNA in polyacrilamide gels. **Eletrophoresis**, v. 8, p. 93-99, 1987.
- BORGHETTI. et al. **Uma visão geral sobre a produção de organismos aquáticos no Brasil e no mundo**. Curitiba: Grupo Integrado de Aquicultura e Estudos Ambientais – UFPR, p 129p. 2003.

BOUGATEF, A. et al. Purification and characterization of trypsin from the viscera of sardine (*Sardina pilchardus*). **Food Chemistry**, v. 102, n. 1, p. 343-350, 2007.

BOUGATEF, A. et al. Trypsins from fish processing waste: characteristics and biotechnological applications—comprehensive review. **Journal of Cleaner Production**, v. 57, p. 257-265, 2013.

BRADFORD, M. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding. **Analytical Biochemistry**, 72, 248–254. 1976.

BRASIL. **Boletim de Pesca e Aquicultura 2010, Ministério da Pesca e aquicultura, Brasília, (2012)**. Disponível em<
http://www.mpa.gov.br/images/Docs/Informacoes_e_Estatisticas/Boletim%20Estat%20C3%ADstico%20MPA%202010.pdf> Acesso em: Fevereiro de 2015.

BREWER, P., HELBIG, N., e HAARD, N. F. Atlantic cod pepsin. Characterization and use as a rennet substitute. **Canadian Institute of Food Science and Technology Journal**, 17, 38–43. 1984.

BRITSKI, H. A.; SATO, Y.; ROSA, A. B. S. **Manual de identificação de peixes da região de Três Marias: com chaves de identificação para os peixes da Bacia do São Francisco**. 2a ed. Brasília: CODEVASF. 115 p. 1996.

CAI, Q. et al. Biochemical characterization of trypsins from the hepatopancreas of Japanese sea bass (*Lateolabrax japonicus*). **Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology**, v. 159, n. 3, p. 183-189, 2011.

CAMPBELL, M. K. **Bioquímica**. 3ª ed. São Paulo: Artes Médicas, 2003

CAREY, F. A.; SUNDBERG, R. J. **Advanced Organic Chemistry: Part A: Structure and Mechanisms**, ed 5. Springer, 2007.

CASTILLO-YANEZ, et al. Isolation and characterization of trypsin from pyloric caeca of Monterey sardine *Sardinops sagax caerulea*. **Comparative Biochemistry and Physiology**, 140B, 91–98. 2005.

CHARLES, et al., On trypsinogen and trypsin of pig. **Biochem Biophys Acta**, v. 69, p. 115-129. 1963.

CHEN, et al. Influence of degree of hydrolysis on functional properties, antioxidant and ACE inhibitory activities of egg white protein hydrolysate. **Food Science and Biotechnology**, v. 21, n. 1, p. 27-34, 2012.

CHONG; et al. Partial characterization and activities of proteases from the digestive tract of discus fish (*symphysodn aequifasciata*). **Aquaculture**, v. 203, p. 321-333. 2002.

- COSTA, Helane MS et al. Metal-sensitive and thermostable trypsin from the crevalle jack (*Caranx hippos*) pyloric caeca: purification and characterization. **Chemistry Central Journal**, v. 7, n. 1, p. 166, 2013.
- COX, M. M.; DOUDNA, J. A. O'DONNELL, M. **Biologia molecular: princípios e técnicas**, Artmed, 2012.
- CYRINO, J. E. P. **Sistemas de Produção em Piscicultura**. Fundação de estudos Agrários Luiz de Queiroz, USP, Piracicaba, 1996.
- DARKOH, C; KAPLAN, H. B.; DUPONT, H. L., et al. Harnessing the glucosyltransferase activities of *Clostridium difficile* for functional studies of toxins A and B. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 49, p. 2933-2941. 2011.
- DELAAGE, M., et al. On the activations of trypsinogen. A study of peptide models related to the N-terminal sequence of the zymogen. **Biochem. Biophys. Res. Commun**, v. 29, p. 235-240, 1967.
- EUSEBIO, P. S.; COLOSO, R. M. Proteolytic enzyme activity of juvenile asia sea bass, *Cates calcarifer* (Beach), is increased with protein intake. **Aquaculture**, v. 33, p. 569- 574. 2002.
- ESPÓSITO, T. S. **Aplicação de Proteases Alcalinas das Vísceras do Tambaqui (*Colossoma macropomum*) e da Carpa (*cyprinus carpio*) como aditivo de Detergentes em pó**. Dissertação (Mestrado em Recursos Pesqueiros e Aquicultura) Universidade Federal de Pernambuco, Recife, PE, 2006.
- ESPÓSITO, Talita S. et al. Fish processing waste as a source of alkaline proteases for laundry detergent. **Food Chemistry**, v. 112, n. 1, p. 125-130, 2009.
- FAO – **Organização das Nações Unidas para a Agricultura e Alimentação**. The State of World Fisheries and Aquaculture, 2010. Disponível em: <<http://www.fao.org/fishery/sofia/en>>. Acesso em: Janeiro de 2015.
- FAO-SOFIA. The state of world fisheries and aquaculture (SOFIA) 2004. FAO Fisheries Department, Rome tuna (*Thunnus albacores*) spleen: purification and characterization. **Comp Biochem Physiol**, 144B:47–56. 2004.
- FERNANDES, R.; GOMES, L.C.; AGOSTINHO, A.A. Pesque-pague: negócio ou fonte de dispersão de espécies exóticas, Acta Scientiarum. **Biological Sciences**, v.25, p.115-120. 2003.
- FRANÇA, R. C. P. **Caracterização bioquímica e molecular da tripsina dos cecos pilóricos do Bijupirá (*Rachycentron canadum*) e a sua compatibilidade com formulações de detergentes**. Tese (doutorado em Ciências Biológicas da universidade Federal de Pernambuco), Recife, 2013.
- FREITAS-JÚNIOR, A. C. V et al. Giant Amazonian fish pirarucu (*Arapaima gigas*): its viscera as a source of thermostable trypsin. **Food chemistry**, v. 133, n. 4, p. 1596-1602, 2012.

FUKUNAGA, et al. Identification and Functional Characterization of a Presqualene Diphosphate Phosphatase, **The Journal of Biological Chemistry**, 2006. v. 281, p. 9490–9497, 2006

FUCHISE, et al. Purification and characteristics of trypsins from cold-zone fish, Pacific cod (*Gadus macrocephalus*) and saffron cod (*Eleginus gracilis*), **Food Chemistry**, v. 116, p. 611-616, 2009.

GATES, B. J., e TRAVIS, J. Isolation and comparative properties of shrimp trypsin. **Biochemistry**, 1969. v. 8, p. 4483–4489, 1969.

GALVÃO, C. M. A., **Hidrólise comparada de proteínas do soro láctico usando tripsina e quimiotripsina imobilizadas em diferentes suportes**. Tese (doutorado em Engenharia Química) Universidade Federal de São Carlos, SP, 2004.

GE healthcare, **Affinity chromatography columns and media, selection guide**. 18-1121-86 AK, 2009.

GE Healthcare Life Science. Disponível em <http://www.gelifesciences.com/webapp/wcs/stores/servlet/productById/en/GELiSciences-br/17061260>> Acessado em Janeiro de 2016.

GENDRY, Patrick; LAUNAY, Jean-Francois. Purification and characterization of a trypsin-like protein from rat pancreas. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)- Protein Structure and Molecular Enzymology**, v. 955, n. 2, p. 243-249, 1988.

GUPTA, R.; BEG, Q.; LORENZ, Patrick. Bacterial alkaline proteases: molecular approaches and industrial applications. **Applied microbiology and biotechnology**, v. 59, n. 1, p. 15-32, 2002.

GUYONNET, V. et al. Purification and partial characterization of the pancreatic proteolytic enzymes trypsin, chymotrypsin and elastase from the chicken. **Journal of Chromatography A**, v. 852, n. 1, p. 217-225, 1999.

HARVEY, R. A; FERRIER, D. R. **Bioquímica Ilustrada**. Artmed, 2012.

HAU, P. V., e BENJAKUL, S. Purification and characterization of Trypsin from pyloric caeca of bigeye snapper (*Pracanthus macracanthus*). **Journal of Food Biochemistry**, 2006. 30, 478–495.

HERBOTS, I. et al. Enzymes, 4. Non-food Application. **Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry**, 2008.

HERNANDEZ-LEDESMA, et al. Antihypertensive peptides: Production, bioavailability and incorporation into foods, **Advances in Colloid and Interface Science**, v.165, p. 23–35, 2011.

HE, A; ROSAZZA, J. P. N. GTP Cyclohydrolase I: Purification, Characterization, and Effects of Inhibition on Nitric Oxide Synthase in *Nocardia* Species Aimin, **Applied and Environmental Microbiology**, v. 69, p. 7507-7513. 2003.

HEU, M. S., KIM, H. R., e PYEUN, J. H. Comparison of trypsin and chymotrypsin from the viscera of anchovy, *Engraulis japonica*. **Comparative Biochemistry and Physiology**, 112B, p. 557–567, 1995.

HOFER, R.; SCHIEMER, F. Proteolytic activity in the digestive tract of several species of fish with different feeding habits. **Oecologia**, v. 48, p. 342–345, 1981.

JELLOULI et al., New alkaline trypsin from the intestine of grey triggerfish (*Balistes capriscus*) with high activity at low temperature: Purification and characterization. **Food Chemistry**, 116, 644–650, 2009.

JOHNSON, D. A.; TRAVIS, J. Rapid purification of human trypsin and chymotrypsin I. **Analytical biochemistry**, v. 72, n. 1, p. 573-576, 1976.

JUN- SHENG; el al. Otogeny of protease, amylase and lipase in the alimentary tract of hibrid juvenile tilapia (*Oreochromis niloticus X Oreochromis aureus*). **Physiol Biochem**, V. 32, p. 295-303, 2006.

KANNO, et al., H. Purification and characteristics of trypsin from masu salmon (*Oncorhynchus masou*) cultured in fresh-water. **Fish Physiology and Biochemistry**, 36, 637–645, 2010.

KHALED, et al., Purification and characterization of three trypsin isoforms from viscera of sardinelle (*Sardinella aurita*). **Fish Physiology and Biochemistry**, 37, 123–133. 2011.

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

KHANTAPHANT, S.; BENJAKUL, S. Purification and characterization of trypsin from the pyloric caeca of brownstripe red snapper (*Lutjanus vitta*). **Food chemistry**, v. 120, n. 3, p. 658-664, 2010.

KIM, N. et al. Production of functional recombinant bovine trypsin in transgenic rice cell suspension cultures. **Protein expression and purification**, v. 76, n. 1, p. 121-126, 2011.

KIM, M; JEONG, Y, Purification and characterization of a trypsin-like protease from flatfish (*paralichthys olivaceus*) intestine, **Journal of Food Biochemistry**, v. 37, p. 723-741, 2013.

KIM, Nan-Sun et al. High-level production of recombinant trypsin in transgenic rice cell culture through utilization of an alternative carbon source and recycling system. **Enzyme and microbial technology**, v. 63, p. 21-27, 2014.

KISHIMURA, et al., Characteristics of trypsin from the pyloric ceca of walleye pollock (*Theragra chalcogramma*). **Food Chemistry**, v. 106, p. 194–199, 2008.

KIRK, O.; BORCHERT, T. V.; FUGLSANG, C. C.. Industrial enzyme applications. **Current opinion in biotechnology**, v. 13, n. 4, p. 345-351, 2002.

KISHIMURA, et al., Trypsins from the pyloric ceca of jacobever (*Sebastes schlegelii*) and elkhorn sculpin (*Alcichthys alcicornis*): Isolation and characterization. **Food Chemistry**, v. 100, p. 1490–1495, 2007.

KLOMKLAO, et al. A predominant protease purified from the viscera of hybrid catfish (*Clarias macrocephalus* _ *Clarias gariepihus*). **Food Chemistry**, v. 129, p. 729–746, 2011.

KLOMKLAO, S., BENJAKUL, S., VISESSANGUAN, W., KISHIMURA, H., SIMPSON, B. K., & SAEKI, H. Trypsins from yellowfin tuna (*Thunnus albacores*) spleen: Purification and characterization. **Comparative Biochemistry and Physiology**, v. 144, p. 47–56, 2006.

KLOMKLAO, et al. Purification and characterisation of trypsins from the spleen of skipjack tuna (*Katsuwonus pelamis*). **Food Chemistry**, v.100, 1580–1589, 2007.

KTARI, et al. Trypsin from zebra blenny (*Salaria basilisca*) viscera: Purification, characterization and potential application as a detergent additive. **Food Chemistry**, v. 130, p. 467–474, 2012.

KUMAR, C. G, TAKAGI. H. Microbial alkaline proteases: from a bioindustrial viewpoint. **Biotechnol Adv**, v. 17, p. 561–594, 1999.

KUMAR, S; et al. Digestive proteases of three carps *catla catla*, *Labeo rohita* and *hypophthalmichthys moletrix*: partial characterization and protein hidrolisis efficiency. **Aquaculture nutrition**, v. 13, p. 381-388, 2007.

KURTOVIC, I., MARSHALL, S. N., e SIMPSON, B. K. Isolation and characterization of a trypsin fraction from the pyloric ceca of chinook salmon (*Oncorhynchus tshawytscha*). **Comparative Biochemistry and Physiology**, v. 143, p. 432–440, 2006.

KUSNADI, Ann R.; NIKOLOV, Zivko L.; HOWARD, John A. Production of recombinant proteins in transgenic plants: practical considerations. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 56, n. 5, p. 473-484, 1997.

LACERDA, Caroline Dutra et al. Gamma trypsin: Purification and physicochemical characterization of a novel bovine trypsin isoform. **International journal of biological macromolecules**, v. 70, p. 179-186, 2014.

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

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

LLORENTE, B. E. et al. Use of artichoke (*Cynara scolymus*) flower extract as a substitute for bovine rennet in the manufacture of Gouda-type cheese: characterization of aspartic proteases. **Food chemistry**, v. 159, p. 55-63, 2014.

LOPES, A. R. et al., Substrate especificity insect of trypsins and the role of their subsites in the catalysis. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**.v.36. p. 130-140, 2006.

LINEWEAVER, H., e BURK, D. The determination of enzyme dissociation constants. **Journal of the American Chemical Society**, v. 56, p. 665–666, 1934.

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

MACIEL MENDES, C. **Avaliação da estabilidade de proteases de intestino de Tilápia do Nilo como aditivo para a indústria de detergentes**. 2007.

MAHN, A; ISMAIL M, Depletion of highly abundant proteins in blood plasma by ammonium sulfate precipitation for 2D-PAGE analysis, **Journal of Chromatography B**, 2011, v. 879, p. 3645-3648.

MACALDOWIE, C. N.; MACKELLAR, A.; HUNTLEY, J. F. The isolation and purification of a dual specific mast cell-derived protease from parasitised caprine jejunal tissue. **Research in veterinary science**, v. 64, n. 1, p. 17-24, 1998.

MÁRCIA M. S. et al. Purification of pectinases from *Aspergillus niger* ATCC 9642 by ethanol precipitation. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 4, n. 3, p. 315-320, 2015.

MARCUSCHI, Marina et al. Purification, characterization and substrate specificity of a trypsin from the Amazonian fish tambaqui (*Colossoma macropomum*). **Biochemical and biophysical research communications**, v. 396, n. 3, p. 667-673, 2010.

MARIAM, et al. Purification of rabbit polyclonal immunoglobulin G with ammonium sulphate precipitation and mixed-mode chromatography, **Separation and Purification Technology**, v.144, p. 133-138, 2015.

MARTINEZ, A., OLSEN, R. L., e SERRA, J. L. Purification and characterization of two trypsin-like enzymes from the digestive tract of anchovy *Engraulis encrasicolus*. **Comparative Biochemistry and Physiology**, v. 91, p. 677–684, 1988.

MAURER, K. H. (2004). Detergent Proteases. **Current Opinion in Biotechnology**, v.15, p. 330–334, 2004.

MINAYA, M. A. B. **avaliação das atividades Farmacológicas de uma serinoprotease, isolada apartir do veneno total de *Bothrops barnetti***. Dissertação (Mestrado em Biologia Funcional e Molecular) Universidade Estadual de Campiinas, Campiinas, SP. 2012.

Ministério da Educação. **Aquicultura**. Brasília 2006

MPA– **Ministério da Pesca e Aquicultura** – Disponível em <http://www.mpa.gov.br/index.php/pesca> Acesso em: Janeiro de 2015.

MITIDIERI, S. et al. Detergentes biológicos biodegradáveis: avaliação das formulações do mercado. **Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento**, v. 5, n. 26, p. 56-60, 2002.

NASRI et al. Calcium dependent, alkaline detergent-stable trypsin from the viscera of Goby (*Zosterisessor ophiocephalus*): Purification and characterization, **Process Biochemistry**, v. 47, p. 1957–1964, 2012.

NELSON. D. L.; C. M. M. **Princípios de Bioquímica de Lehninger**. Sarvier, 5 ed. São Paulo, 2009.

NEURATH, H. The versatility of proteolytic enzymes. **J Cell Biochem**, v. 32, p. 35-49, 1986.

NGOC, D. P. et al. Characterization of immunogenic *Clonorchis sinensis* protein fractions by gel filtration chromatography. **Asian Pacific Journal of Tropical Disease**, v. 5, n. 4, p. 284-288, 2015.

ODDEPALLY, Rajender; SRIRAM, Gopi; GURUPRASAD, Lalitha. Purification and characterization of a stable Kunitz trypsin inhibitor from *Trigonella foenum-graecum* (fenugreek) seeds. **Phytochemistry**, v. 96, p. 26-36, 2013.

OLIVEIRA, R. C. O panorama da Agricultura no Brasil: A Prática com Foco na Produtividade. **Revista Intertox de Toxologia, Risco Ambiental e Sociedade**. 2009. Vol. 2, Nº1, 71-89.

PANYAM, D; KILARA, A, Enhancing the functionality of food proteins by enzymatic modification, **Trends in Food Science & Technology**, v. 71, p. 120-125, 1996.

PINSKY, SETH D.; LAFORGE, K. STEVEN; SCHEELE, GEORGE. Differential regulation of trypsinogen mRNA translation: full-length mRNA sequences encoding two oppositely charged trypsinogen isoenzymes in the dog pancreas. **Molecular and cellular biology**, v. 5, n. 10, p. 2669-2676, 1985.

RAO, M. B. et al. Molecular and biotechnological aspects of microbial proteases. **Microbiology and molecular biology reviews**, v. 62, n. 3, p. 597-635, 1998.

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

ROPPA, L. **Perspectivas da produção mundial de carnes, 2007 a 2015**. Disponível em: <http://pt.engormix.com/member_login.aspx?referer=yes> Acesso em: janeiro de 2015. 2009.

ROTTA, M. A. **Aspectos gerais da fisiologia e estrutura do Sistema digestivo dos peixes relacionados à piscicultura**- Corumbá: Embrapa Pantanal, 2003.

SAHIN-TOTH, M. Biochemical model of hereditary pancreatitis. **Endocrinol. Clin. North Am.**, v. 35, p. 303-312, 2006.

SANTOS, F. G. B. **Caracterização Fenotípica e Molecular de Bactérias com Potencial Patogênico em Pacamã de (*Luphiosilurus alexandri* Steindachner, 1877)**. Dissertação (mestrado em zootecnia) Universidade Federal do Vale do São Francisco. Petrolina-PB. 2011.

SARTORI, A. G. O.; AMANCIO, R. D. Pescado: importância nutricional e consumo no Brasil. **Segurança alimentar e nutricional**, v. 19, n. 2, p. 83-93, 2012.

SATO, Y; FENERICH-VERANI, N.; GODINHO, H.P. **Reprodução induzida de peixes da bacia do São Francisco**. In: GODINHO, H.P.; GODINHO, A.L. (Eds.) Águas e peixes e pescadores do São Francisco das Minas Gerais. Belo Horizonte: PUC Minas. p.275-290. 2003.

SABAPATHY, U.; TEO, L.H. A quantitative study of some digestive enzymes in the rabbitfish, *Siganus canaliculatus* and the sea bass, *Lates calcarifer*. **Jornal of Fish Biology**, v. 42, p. 595-602, 1993.

SCHYNS, et al. Purification, properties and N-terminal sequence of sheep trypsinogen. **Biochimica et biophysica acta**, v. 175, n. 1, p. 97, 1969.

SEABRA, A. G. L. **Manejo alimentar das fases iniciais do Pacamã (*Luphiosilurus alexandri*)**, Universidade Federal do Vale do São Francisco; Programa de Pós-graduação em Nutrição Animal. PE. 2010.

Sebrae. (2007) – Serviço Brasileiro de Apoio às Micro e Pequenas Empresas. **Criação de tilápias em tanques-redes**. Disponível em: <[http://www.biblioteca.sebrae.com.br/bds/bds.nsf/7227d4d9d30ab6cc832573a9006d4bc/\\$file/nt0003737a.pdf](http://www.biblioteca.sebrae.com.br/bds/bds.nsf/7227d4d9d30ab6cc832573a9006d4bc/$file/nt0003737a.pdf)>. Acesso em: out. 2011.

SCHILLBERG, Stefan; TWYMAN, Richard M.; FISCHER, Rainer. Opportunities for recombinant antigen and antibody expression in transgenic plants—technology assessment. **Vaccine**, v. 23, n. 15, p. 1764-1769, 2005.

SCHULZE, Peter et al. Advanced process for precipitation of lignin from ethanol organosolv spent liquors. **Bioresource technology**, v. 199, p. 128-134, 2016.

SIDONIO, L. et al. **Panorama da aquicultura no Brasil: desafios e oportunidades**. BNDES Setorial, v. 35, p. 421-463, 2012.

SIGMA-ALDRICH, **Sepharose Ion Exchange Media**, Disponível em <http://www.sigmaaldrich.com/content/dam/sigmaaldrich/docs/Sigma/Product_Information_Sheet/df100pis.pdf> Acesso em Janeiro de 2016.

SHI, C; MARSHALL, S. N.; SIMPSON, B. K. Purification and characterization of trypsin from the pyloric caeca of the New Zealand hoki fish (*Macruronus novaezealandiae*). **Journal of food biochemistry**, v. 31, n. 6, p. 772-796, 2007.

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

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

SILVA, M. S. G. M. **Desenvolvimento de um sistema de recirculação com uso de wetlands construídas para efluentes da piscicultura**. Doutorado (Tese de doutorado em Engenharia Agrícola na área de concentração em água e solo) . Universidade Federal de Campinas, Campinas- SP, 2012.

SILVA, E. T.; **Estabilização de Proteases para Aplicação Biotecnológica**. Dissertação (Mestrado em desenvolvimento em processos ambientais) universidade católica de pernambuco, Recife 2013.

SIMPSON, B. K., e HAARD, N. F. Trypsin from Greenland cod (*Gadus ogac*), isolation and comparative properties. **Comparative Biochemistry and Physiology B**, v. 79, p. 613–622, 1984.

SIMPSON, B. K. **DIGESTIVE PROTEINASES FROM MARINE ANIMALS**. In N. F. Haard & B. K. Simpson (Eds.), *Seafood enzymes: Utilisation and influence on postharvest seafood quality*. 531–540, 2000.

SIRTORI et al. Nutritional and nutraceutical approaches to dyslipidemia and atherosclerosis prevention: focus on dietary proteins. **Atherosclerosis**, v. 203. p. 8-17, 2009.

SOUZA, et al. Trypsin-like enzyme from intetsine and pyloric caeca of spotted goatfish (*Pseudupeneus maculatus*). **Food Chemistry**, v. 100, p. 1429–1434, 2007.

SOUZA, M. G. **Proteína Bruta na Dieta e identificação da Microbiota aeróbica intestinal do Pacamã *Luphiosilus alexandri* Steindachner (siluriformes, Pimelodidae) nas fases iniciais de cultivo**. Universidade Federal do Vale do São Francisco. Programa de Pós-Graduação em ciência Animal, PE. 2010.

SRIKET, et al Low molecular weight trypsin from hepatopancreas of freshwater prawn (*Macrobrachium rosenbergii*): Characteristics and biochemical properties, **Food Chemistry**, v. 134. p. 351-358, 2012.

STETH, M.R. et al., **Fatores que afetam a produção de enzimas digestivas de peixes e o uso de enzimas exógenas como ferramentas em nutrição de peixes**. Disponível em <<http://www.redalyc.org/pdf/260/26015684008.pdf>> Acesso em janeiro de 2016

STRYER, L.; TYMOCZKO, J.L.; BERG, J.M. **Bioquímica**. Editora Guanabara Koogan LTDA. 6ª Ed. Rio de Janeiro. 2006.

SYROVY, L.; HODNY, Z. Staining and quantification of proteins separated by polyacrylamid gel eletrophoresis. **Journal of Chromatography**, v. 569, p. 175-169, 1991.

TAVANO, Olga Luiza. Protein hidrolisis using proteases: Na importante tool for food biotechnology. **Juornal of Molecular Catalysis B; Enzymatic**, 2013, p. 1-11

TENGJAROENKUL, B.; SMITH, B.J.; CACECI, T.; SMITH, S.A. Distribution of intestinal enzyme activities along the intestinal tract of cultured Nile tilapia, *Oreochromis niloticus* L. **Aquaculture**, v. 182, p. 317-327, 2000.

TENÓRIO, R. A. **Aspectos da Biologia Reprodutiva do Niquim *Lophiosilurus alexandri* Steindachner, 1876 (Actinopterygii, Pimelodidae) e Crescimento da Progênie em Diferentes Condições Ambientais**. Dissertação (Mestrado em Recursos Pesqueiros e Aquicultura) Univiersidade Federal Rural de Pernambuco.Recife, PE, 2003.

THYS, R. **Produção, caracterização de uma protease prduzida pelo microorganismo *Microbacterium sp.*** Dissertação (Mestrado em Microbiologia agrícola e de Meio ambiente) Universidade federal do Rio Grande do su,l, Porto alegre, 2004

TIAN, Li; et al. A cost-effective ELP-intein coupling system for recombinant protein purification from plant production platform. **PLoS one**, v. 6, n. 8, p. e24183, 2011.

TRAVASSOS, H. Nótula sobre o pacamã, *Lophiosilurus alexandri* Steindachner, 1876. **Atas da Sociedade de Biologia do Rio de Janeiro**, v. 4, p. 1-2, 1959.

UPADHYAY et al., Purification of recombinant ovalbumin from inclusion bodies of *Escherichia coli*, **Protein Expression and Purification**, v.117, p. 52–58. 2015.

VAN BOEKEL, Martinus et al. A review on the beneficial aspects of food processing. **Molecular nutrition & food research**, v. 54, n. 9, p. 1215-1247, 2010.

VASCONCELOS, M. A. et al. Purification and primary structure of a novel mannose-specific lectin from *Centrolobium microchaete* Mart seeds. **International journal of biological macromolecules**, v. 81, p. 600-607, 2015.

VERMELHO, A. B. et al. Enzimas proteolíticas: Aplicações biotecnológicas. **Enzimas em biotecnologia-Produção, aplicações e mercado**, p. 273-287, 2008.

VILLALBA, et al. Trypsin from viscera of vermiculated sailfin catfish, *Pterygoplichthys disjunctivus*, Weber, 1991: Its purification and characterization. **Food chemistry**, v. 141, p. 940-945, 2013.

VILLALBA-VILLALBA, et al. Partial characterization of alkaline proteases from viscera of vermiculated sailfin catfish *Pterygoplichthys disjunctivus* Weber, 1991. **Fisheries Science**, v. 77, 697–705, 2011.

VOJCIC, L. et al. Advances in protease engineering for laundry detergents. **New biotechnology**, v. 32, n. 6, p. 629-634, 2015.

XIU, Y. et al. Isolation and characterization of two novel C-type lectins from the oriental river prawn, *Macrobrachium nipponense*. **Fish & shellfish immunology**, v. 46, n. 2, p. 603-611, 2015.

XU, J. et al. Green factory: plants as bioproduction platforms for recombinant proteins. **Biotechnology advances**, v. 30, n. 5, p. 1171-1184, 2012.

ZANIBONI FILHO, E.; LUZ, R.K. Utilização de diferentes dietas na primeira alimentação do mandi-amarelo (*Pimelodus maculatus*, Lacépède). **Acta scientiarum**, v.23, n.2, p.483- 489, 2001.

ZANIN, G.M.; MORAIS, F. F. **Enzimas como agentes biotecnológicos**; Said, S.; Pietro, R. C. L. R., eds.; Legis Summa: Ribeirão Preto, cap 4, p. 35-82, 2004.

ZHAO et al. Enzymatic hydrolysis and their effects on conformational and functional properties of peanut protein isolate, **Food Chemistry**. v. 127, p. 1438–1443, 2011.

ZHAO, et al. Ping. Development of a rapid high-efficiency scalable process for acetylated *Sus scrofa* cationic trypsin production from *Escherichia coli* inclusion bodies. **Protein expression and purification**, v. 116, p. 120-126, 2015.

ZWILLING, R. et al. The evolution of endopeptidases—V. Common and different traits of bovine and c crayfish trypsin. **Comparative biochemistry and physiology**, v. 28, n. 3, p. 1275-1287, 1969.

YANG, et al. Serine Proteases of Parasitic Helminths. **Korean J Parasitol**, 2015, v. 53, p.1-11.

WEI et al. Purification, characterization and biological activities of the L-amino acid oxidase from *Bungarus fasciatus* snake venom, **Toxicon**, v.54, p. 262-271, 2009.

WISEMAN, A. Manul de Biotecnologia de los enzimas. **Zaragoza**, p. 444, 1991.

WOODARD, S. L. et al. Maize (*Zea mays*)-derived bovine trypsin: characterization of the first large-scale, commercial protein product from transgenic plants. **Biotechnology and Applied Biochemistry**, v. 38, n. 2, p. 123-130, 2003.