

UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALAGOAS
ESCOLA DE ENFERMAGEM E FARMÁCIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOQUÍMICA E BIOLOGIA MOLECULAR

DÁVIDA MARIA RIBEIRO CARDOSO DOS SANTOS

**Purificação e Caracterização da tripsina isolada do *Coryphaena hippurus*
(dourado do mar)**

Maceió-AL

2018

DÁVIDA MARIA RIBEIRO CARDOSO DOS SANTOS

**Purificação e Caracterização da tripsina isolada do *Coryphaena hippurus*
(dourado do mar)**

Dissertação de mestrado apresentada no Programa de Pós-Graduação em Bioquímica e Biologia Molecular da Universidade Federal de Alagoas, como requisito parcial para obtenção do grau de mestre em Bioquímica e Biologia Molecular.

Orientador: Prof. Dr. Hugo Juarez Vieira Pereira

Co-orientação: Profa. Dra. Maria Elena de Lima Perez Garcia

Maceió-AL

2018

Catálogo na fonte
Universidade Federal de Alagoas
Biblioteca Central

Bibliotecária Responsável: Helena Cristina Pimentel do Vale

S237p Santos, Dávida Maria Ribeiro Cardoso dos.
Purificação e caracterização da tripsina do *Coryphaena hippurus*
(dourado do mar) / Dávida Maria Ribeiro Cardoso dos Santos. – 2018.
67 f. : il.

Orientador: Hugo Juarez Vieira Pereira.

Coorientadora: Maria Elena de Lima Perez Garcia.

Dissertação (Mestrado em Bioquímica e Biologia Molecular) – Universidade Federal de Alagoas. Escola de Enfermagem e Farmácia. Maceió, 2018.

Bibliografia: f. 60-67.

1. *Coryphaena hippurus*. 2. Dourado do mar. 3. Peixes – Caracterização por cromatografia. 4. Tripsina – Purificação. 5. Enzimas – Aplicações industriais.
I. Título.

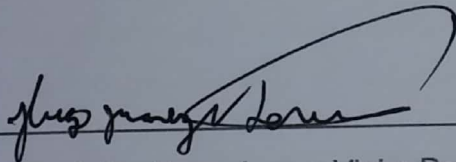
CDU: 579.222

Folha de Aprovação

DÁVIDA MARIA RIBEIRO CARDOSO DOS SANTOS

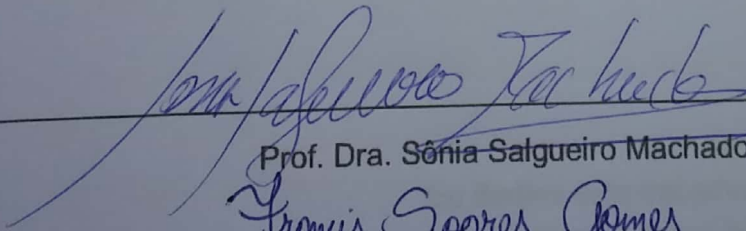
Purificação e caracterização da tripsina isolada do *Coryphaena hippurus* (dourado do mar), dissertação de mestrado em Bioquímica, na Universidade Federal de Alagoas, na forma normalizada e de uso obrigatório.

Dissertação submetida ao corpo docente do Programa de Pós-Graduação em Bioquímica e Biologia Molecular da Universidade Federal de Alagoas e aprovada em.

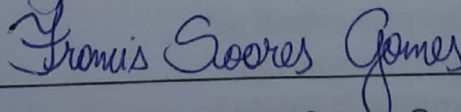


Prof. Dr. Hugo Juarez Vieira Pereira, Universidade Federal de Alagoas

Banca Examinadora



Prof. Dra. Sônia Salgueiro Machado



Prof. Dr. Francis Soares Gomes

DEDICATÓRIA

Eu dedico este trabalho as pessoas que me ajudaram a chegar até aqui, a meus pais: Luciano Cardoso e Maria Helena Ribeiro, a minha irmã Camila Ribeiro, a meu esposo Marcos Oliveira, eles sempre me incentivaram e apoiaram para que essa graça fosse alcançada.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus e a Nossa Senhora pela graça de me ajudar a chegar até aqui, sem a providência do céu eu nunca conseguiria alcançar essa graça.

Minha gratidão aos meus pais, a quem dedico este trabalho. O esforço de uma vida me ajudou a vencer cada etapa. À minha irmã, Camila Ribeiro que sempre me apoiou e incentivou a fazer o mestrado.

Meu muitíssimo obrigado ao meu esposo Marcos Oliveira que sempre esteve ao meu lado durante todo o mestrado, incentivando e me ajudando em cada dificuldade. A minha filha, Maria Cecília que durante a escrita desse trabalho esteve sempre comigo e se tornou mais um incentivo para a conclusão desta etapa.

Agradeço a todos que caminharam comigo durante o mestrado no Laboratório de análise Metabolômica e Proteômica (LAMP) da UFAL, primeiramente ao meu orientador professor Dr. Hugo Juarez, por sua dedicação e ensino em todos os passos da pesquisa. A todos os amigos do LAMP, professores: Francis Soares e Edma Miranda e aos amigos da bancada e da vida: Tatielle Pereira, Cláudio Santos, Elizabeth Costa, Fabiana Albuquerque, Cledson Barros, Humberto Tenório, Monyze Costa Roberta, Janaína Kivia, Gabriela Bernardes, Ricardo Costa, Antônio Thomas, Josiel, Laís, Marta, João, Eric e a todos que fazem parte dessa família LAMP.

A todos os meus irmãos da comunidade de aliança e missão Herdeiros da Graça, que me acompanharam com suas orações e incentivos.

A todos os laboratórios parceiros que direta e indiretamente me ajudaram a executar este trabalho.

Ao programa de Pós-Graduação em Bioquímica e Biologia Molecular, à Universidade Federal de Alagoas, à Fundação de Amparo e Pesquisa do Estado de Alagoas (FAPEAL), à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de nível Superior (CAPES).

RESUMO

A utilização de enzimas como catalisadores industriais vem crescendo nos últimos anos e as proteases são a classe de enzimas com maior emprego nesses processos, correspondem cerca de 60% do mercado de enzimas. Entre as proteases destaca-se as tripsinas que são enzimas digestivas importantes nos animais, atuam hidrolisando as ligações peptídicas em C-terminais de resíduos de lisina e arginina. As fontes de enzimas são diversas: animais, vegetais e micro-organismos, porém com o avanço do desenvolvimento sustentável, a utilização de resíduos orgânicos provenientes da pesca vem se tornando fontes importantes de enzimas. Devido às características que as enzimas digestivas de animais marinhos apresentam, como alta estabilidade térmica e a variações de pH, características importantes para processos industriais, como aditivos em detergentes, entre outros, essas são cada vez mais estudadas. Nosso objetivo nesse trabalho foi isolar e caracterizar a tripsina do *Coryphaena hippurus* (dourado do mar) peixe de médio porte proveniente da praia de Ponta Verde, Maceió-AL. O isolamento foi conseguido com fracionamento salino e cromatografia de gel-filtração S-100 HR. A purificação pode ser confirmada com um SDS-PAGE a 15%, onde visualizou apenas uma banda em 26 kDa, massa molecular compatível com outras tripsinas de peixes. A tripsina isolada apresentou K_m e K_{cat} de 0,035 mM e 241,037 S⁻¹ respectivamente. Com relação à temperatura e pH a enzima apresentou temperatura ótima entre 40° a 50°C e estabilidade em pH variando do pH 5,0 a 10,0, característica comum entre as enzimas de peixes, principalmente devido a adaptação ao ambiente marinho e aos hábitos alimentares. A tripsina foi totalmente inibida pela Benzamidina, SBTI e PMSF inibidores específicos para tripsina, os dois primeiros, e para serino proteases o último. Alguns íons reduziram a atividade da enzima isolada e o Ca²⁺ não reduziu a atividade da mesma. A purificação e caracterização da tripsina do *Coryphaena hippurus* (dourado do mar) mostrou importantes características da enzima, considerando a mesma como promissora na utilização em processos industriais, principalmente devido a alta estabilidade térmica e a variações de pH, contudo mais estudos envolvendo aplicações biotecnológicas devem ser desenvolvidos.

Palavras Chaves: *Coryphaena hippurus*; Tripsina; Purificação, Caracterização, Detergentes.

ABSTRACT

The use of enzymes as industrial catalysts has been growing in recent years and proteases are the class of enzymes with the highest employment in these processes, accounting for about 60% of the enzyme market. Among the proteases the trypsin that are important digestive enzymes in animals are highlighted, they act by hydrolyzing the C-terminal peptide bonds of lysine and arginine residues. The sources of enzymes are diverse: animals, vegetables and microorganisms, but with the advancement of sustainable development, the use of organic wastes from fishing have become important sources of enzymes. Due to the characteristics that the digestive enzymes of marine animals present, such as high thermal stability and variations of pH, important characteristics for industrial processes, as additives in detergents, among others, these are increasingly studied. Our objective in this work was isolated and characterized the trypsin of the *Coryphaena hippurus* (common dolphinfish) medium-sized fish from Ponta Verde beach, Maceió-AL. Isolation was achieved with saline fractionation and S-100 HR gel-filtration chromatography. Purification can be confirmed with a 15% SDS-PAGE where only one band at 26 kDa, molecular mass compatible with other fish trypsins was visualized. The isolated trypsin had K_m and K_{cat} of 0.035 mM and 241.037 S⁻¹, respectively. With respect to temperature and pH, the enzyme had an optimum temperature of 40 ° to 50 ° C and stability to pH ranging from pH 5.0 to 10.0, a common feature among fish enzymes, mainly due to their adaptation to the marine environment and eating habits. Trypsin was totally inhibited by Benzamidine, SBTI and PMSF specific inhibitors for trypsin, the first two, and for the latter serine proteases. Some ions reduced the activity of the enzyme alone and Ca²⁺ did not reduce its active. The purification and characterization of trypsin of *Coryphaena hippurus* (sea gold) showed important characteristics of the enzyme, considering it as promising in industrial processes, mainly due to high thermal stability and variations in pH, but further studies involving biotechnological applications should be developed.

Keywords: *Coryphaena hippurus*; Tripsins; Purification; Characterization e Detergents.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1: Espécimes de <i>Coryphaena hippurus</i> , superior macho, inferior fêmea.....	16
Figura 2: Distribuição Geográfica do <i>Coryphaena hippurus</i> (dourado do mar) no mundo.....	18
Figura 3: Esquema ilustrativo da quebra da ligação peptídica.....	21
Figura 4: Desenho ilustrativo do estômago de peixe carnívoro.....	27
Figura 5: Desenho ilustrativo do intestino de peixe carnívoro.....	28
Figura 6: Imagem da estrutura tridimensional da tripsina do Salmão.....	29
Figura 7: Mecanismo de ação da tripsina.....	31
Figura 8: Esquema ilustrativo da cromatografia de gel-filtração (Exclusão por tamanho).....	35
Figura 9: Esquema ilustrativo da cromatografia de troca iônica.....	36
Figura 10: Esquema ilustrativo da cromatografia de afinidade.....	37
Figura 11: Esquema ilustrativo do fracionamento salino (<i>Salting out</i>).....	39
Figura 12: Cromatografia de gel-filtração S-100 HR com fração 40-60% do fracionamento salino. Linha preta leitura A 280 nm e linha azul leitura 410 nm....	45
Figura 13: Gel SDS-PAGE 15%, etapas da purificação da tripsina do <i>Coryphaena hippurus</i> (dourado do mar), linha 1 padrão de massa molecular, linha 2 extrato bruto, linha 3 fração 40-60%, linha 4 tripsina purificada. Gel corado com comassiae.....	48
Figura 14: Análise de temperatura ótima para tripsina do <i>Coryphaena hippurus</i> (dourado do mar).....	49
Figura 15: Análise da estabilidade térmica da tripsina isolada do <i>Coryphaena hippurus</i> (dourado do mar).....	50
Figura 16: Análise de pH ótimo para tripsina do <i>Coryphaena hippurus</i> (dourado do mar).....	51
Figura 17: Análise da estabilidade da tripsina do <i>Coryphaena hippurus</i> (dourado do mar) em diferentes pH.....	52
Figura 18: Análise da compatibilidade e estabilidade da tripsina purificada em detergentes comerciais.....	57
Figura 19: Curva de Michaelis-Menten para tripsina variando a concentração do substrato BAPNA (0,0015 – 6,0 mM).....	58

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Classificação das enzimas e suas respectivas funções.....	19
Tabela 2: Exemplos das principais enzimas da família das serino proteases...	24
Tabela 3: Análise da atividade específica para tripsina em órgãos do <i>Coryphaena hippurus</i> (dourado do mar).....	43
Tabela 4: Frações do fracionamento salino e suas respectivas atividades específicas para tripsina do <i>Coryphaena hippurus</i> (dourado do mar).....	43
Tabela 5: Resumo da purificação do <i>Coryphaena hippurus</i> (dourado do mar).	47
Tabela 6: Inibidores utilizados frente a tripsina do <i>Coryphaena hippurus</i> (dourado do mar).....	53
Tabela 7: Análise dos efeitos dos íons metálicos na atividade da tripsina do <i>Coryphaena hippurus</i> (dourado do mar).....	55
Tabela 8: Tabela comparativa entre K_m e K_{cat} de tripsinas isoladas de peixes.....	59

LISTA DE ABRAVIATURAS E SIGLAS

Asp	Aspartato
BAPNA	N α -Benzoil D-L arginina 4 nitroanilina
BSA	Soro de albumina bovina
Ca	Cálcio
CP	Ceco-pilórico
Cu	Cobre
DFP	Diisophyfluorophosphate
EDTA	Ácido Etilenodiamino tetra-ácetico
Et	Estômago
FAO	Food and Agriculture Organization
Fe	Ferro
Glu	Glutamato
HCl	Ácido Clorídrico
His	Histidina
HPLC	<i>High performance liquid chromatography</i>
In	Intestino
Kcat	Constante de Catálise
Km	Constante de Michaelis – Menten
Lys	Lisina
Mg	Magnésio
Mn	Manganês
Phe	Fenilalanina
PMSF	Phenylmethyl sulfonyl fluoride
SBTI	Inibidor de tripsina da soja
Ser	Serina
Tris-HCl	<i>Tris hydrochloride</i>
Trp	Triptofano
Tyr	Tirosina
Zn	Zinco

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	13
2. OBJETIVO GERAL	15
2.1 Objetivos Específicos.....	15
3. REVISÃO DE LITERATURA	16
3.1 <i>Coryphaena hippurus</i> (dourado do mar)	16
3.1.1 A espécie <i>Coryphaena hippurus</i>	16
3.1.2 Hábitos alimentares do dourado do mar.....	16
3.1.3 Distribuição Geográfica.....	17
3.2 Biotecnologia Marinha	18
3.3 Enzimas e Biotecnologia	19
3.3.1 Enzimas.....	19
3.3.2 Enzimas na Biotecnologia.....	20
3.4 Proteases	21
3.5 Serino Proteases	24
3.6 Tripsina	25
3.7 Sistema Digestório de Peixes	26
3.8 Tripsina de Peixes	28
3.9 Utilização de resíduos orgânicos como fontes de enzimas	32
3.10 Purificação de Proteínas	33
4. MATERIAIS MÉTODOS	38
4.1 Obtenção de vísceras e preparação do Extrato Bruto.....	38
4.2 Fracionamento Salino (<i>Salting out</i>).....	38
4.3 Cromatografia de Gel-filtração.....	39
4.4 Cálculo de unidades enzimáticas.....	39
4.5 Eletroforese SDS-PAGE 15%.....	40
4.6 Teste de temperatura ótima e estabilidade térmica.....	40
4.7 Teste de pH ótimo e estabilidade em pH.....	40
4.8 Teste de inibição.....	41
4.9 Efeitos dos íons metálicos.....	41
4.10 Zimografia.....	42
4.11 Compatibilidade e Estabilidade em detergentes comerciais.....	42
4.12 Determinação de Proteínas.....	42
4.13 Cinética Enzimática.....	42
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	43
5.1 Obtenção das vísceras e Preparação do Extrato Bruto.....	43
5.2 Fracionamento Salino.....	43
5.3 Cromatografia de Gel-filtração.....	44
5.4 Eletroforese SDS-PAGE 15%.....	47
5.5 Teste de temperatura ótima e Estabilidade Térmica.....	47

5.6	Teste de pH ótimo e Estabilidade em pH.....	50
5.7	Teste de inibição.....	53
5.8	Efeitos dos íons metálicos.....	54
5.9	Zimografia.....	55
5.10	Compatibilidade e Estabilidade em detergentes comerciais.	56
5.11	Determinação de Proteínas.....	58
5.12	Cinética Enzimática.....	58
6.	CONCLUSÕES.....	60
	REFERÊNCIAS.....	61

1. INTRODUÇÃO

Hoje é cada vez maior a quantidade de biomoléculas que são usadas em processos industriais e na pesquisa científica. Há um interesse crescente no estudo de espécies, tanto para a ampliação do conhecimento a cerca delas, como para o conhecimento de suas biomoléculas e suas prováveis utilizações.

Boa parte das biomoléculas usadas atualmente por diversos segmentos industriais são enzimas. Vários desses catalisadores biológicos são usados na indústria têxtil, em produtos de limpeza, fabricação e desenvolvimento de medicamentos e pesquisa de base. Uma das enzimas mais usadas em diferentes cadeias produtivas são as tripsinas. Algumas tripsinas mostram alta aplicabilidade industrial e são provenientes de espécies marinhas de modo geral.

Existem hoje várias espécies no mundo com informações muito escassas tanto sobre comportamento quanto sobre suas potencialidades práticas e a de suas biomoléculas. O dourado do mar (*Coryphaena hippurus*) é uma dessas espécies, no que tange às informações das características das enzimas produzidas por ela, às informações são inexistentes.

A tripsina do dourado do mar, bem como outras tripsinas já isoladas e caracterizadas, pode apresentar aplicações em quaisquer dos âmbitos anteriormente citados, mas nada pode ser afirmado sem que antes se proceda o isolamento e a caracterização da enzima. Esse estudo foi executado para purificar a tripsina importante enzima digestiva e posteriormente caracterizá-la.

As tripsinas (EC 3.4.21.4) são membros pertencentes à família das endoproteases, que agem especificamente sobre a carboxila em ligações peptídicas e de resíduos dos aminoácidos arginina e lisina, quebrando as proteínas por reações de hidrólise (SILA et al., 2012). A tripsina, ao lado das enzimas quimotripsina e elastase são as proteases alcalinas digestivas mais importantes para os peixes, além das proteases ácidas estomacais. Elastase, tripsina e quimotripsina são membros da classe das serino proteases (EC 3.4.21), e são igualmente importantes para os mamíferos na digestão de proteínas (BOUGATEF, 2013).

As enzimas de interesse biotecnológico podem ser extraídas de diversas fontes desde: microrganismos, plantas ou tecidos animais (KTARI et al., 2012). Contudo, algumas fontes de enzimas podem aumentar significativamente o custo do processamento devido à dificuldade na obtenção da mesma, diante disso fontes

enzimáticas biotecnologicamente úteis e baratas são essencialmente importantes para comercialização (BALTI et al., 2009). A utilização de resíduos de peixes para obtenção das enzimas de interesse diminui muito o custo nos processos industriais (KHALED et al., 2011). Outra estratégia importante é a utilização de peixes com alta comercialização e de fácil pesca ou cultivo, entre os peixes analisados como potencial fonte de enzimas de interesse biotecnológico está o dourado do mar (*Coryphaena hippurus*), extremamente apreciado, presente e consumido em toda a costa brasileira (OLSON et al., 2002).

Pertencente a família Coryphaenidae com um único gênero *Coryphaena*, é encontrado em mares tropicais e subtropicais. Esta espécie constitui um importante recurso pesqueiro no litoral brasileiro (OXENFORD, 1999). *Coryphaena hippurus* é um peixe ósseo marinho, oceânico de superfície, alimentam-se principalmente de peixes, crustáceos e cefalópodos (FARRELL et al., 2014).

O dourado do mar, pouco estudado e sem nenhuma informação sobre as enzimas por ele produzidas, é um peixe com grande potencial a ser explorado, uma vez que, suas vísceras são parte dos resíduos sólidos descartados após o consumo e processamento desse animal. Além disso, a tripsina isolada pode, como a de muitos peixes, apresentar aplicação no âmbito científico e tecnológico, mas é necessário antes conhecer suas características bioquímicas.

2. OBJETIVO GERAL

Purificar e caracterizar a tripsina do *Coryphaena hippurus* (dourado do mar).

2.1 Objetivos Específicos

- Preparar extrato bruto do tecido produtor de tripsina do *Coryphaena hippurus* (dourado do mar);
- Realizar fracionamento com sulfato de amônio;
- Purificar a enzima por cromatografia;
- Verificar o grau de pureza e estimar a massa molecular por SDS-PAGE;
- Determinar a temperatura ótima e estabilidade térmica;
- Determinar o pH ótima e estabilidade em pH;
- Analisar a ação de inibidores sobre a tripsina purificada;
- Analisar a influência de íons na atividade da enzima;
- Avaliar a incorporação e atividade enzimática em matriz sólida, zimografia;
- Verificar a compatibilidade e estabilidade da tripsina isolada em detergentes comerciais;
- Determinar a concentração proteica;
- Realizar a cinética enzimática.

3. REVISÃO DE LITERATURA

3.1 *Coryphaena hippurus* (dourado do mar)

3.1.1 A espécie *Coryphaena hippurus*

O *Coryphaena hippurus* é uma espécie de peixe pertencente à família Coryphaenidae, peixe de médio a grande porte, coloração amarelo esverdeada metálica (CARPENTER, 2002). Seu tamanho varia muito, espécies juvenis podem chegar a 30 cm de comprimento, enquanto as espécies adultas podem chegar a 2 metros. O peso entre os espécimes também sofre bastante variação, podendo chegar a 39 kg (SANTOS, 2012).

O dourado do mar apresenta corpo alongado, comprimido lateralmente, mais elevado na altura da região posterior da cabeça, estreitando-se gradualmente em direção à cauda (ROCHA et al., 1999). A espécie apresenta dimorfismo sexual com diferenças anatômicas entre os espécimes macho e fêmea, o macho apresenta uma cabeça mais alta e quadrada em relação à fêmea, figura 1. Essa diferença favorece uma rápida diferenciação dos espécimes no momento da captura, permitindo a não captura de fêmeas no período de reprodução da espécie (NETO, 2005).

Figura 1. Espécimes de *Coryphaena hippurus*, superior macho, inferior fêmea.



Fonte: <https://goo.gl/D1VAmM> Acesso: 31/07/2017 às 10:16

3.1.2 Hábitos alimentares do dourado do mar

O dourado do mar é encontrado em ambientes pelágicos e seu hábito alimentar é típico de animais dessa região, se alimentam de peixes menores,

crustáceos e cefalópodes (MARQUES et al., 2011). A anatomia dos sistemas digestivos de peixes varia muito de acordo com os hábitos alimentares, essa variação vai desde tamanho, morfologia e fisiologia. Os peixes carnívoros em geral apresentam intestino alongado e pode ser dividido em 2 a 3 segmentos, alguns apresentam cecos pilóricos que são projeções ou extensões do intestino para aumentar a superfície de contato desses alimentos (EMBRAPA, 2003).

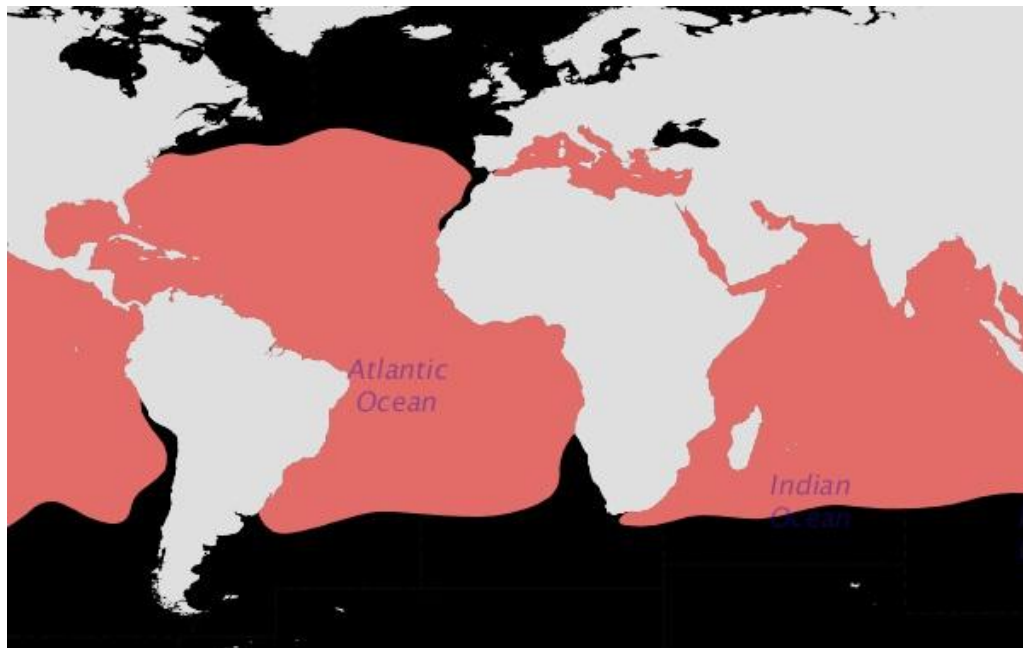
O intestino e os cecos pilóricos são responsáveis por grande parte da digestão dos lipídeos e proteínas e recebem as secreções pancreáticas e biliares, participando da absorção de aminoácidos, carboidratos, lipídeos, água e íons (EMBRAPA, 2003). Seu hábito alimentar influenciou diretamente na escolha desse peixe para a pesquisa, animais de hábitos alimentares carnívoros ou onívoros tem uma maior probabilidade de apresentar enzimas digestivas mais eficientes, devido à necessidade metabólica desses animais.

3.1.3 Distribuição Geográfica

O dourado do mar é um peixe cosmopolita, ocorre em quase todo o mundo em mares com temperaturas entre 21° a 30°C, na figura 2 é possível verificar em vermelho a distribuição do *Coryphaena hippurus*. Ocorre preferencialmente em regiões pelágicas e aproximam-se da costa em busca de águas mais quentes (OXENFORD, 1999).

Ele está entre as poucas espécies pelágicas oceânicas circulantes, onde migram de regiões frias para regiões mais quentes, na fase da reprodução. Sua ocorrência e distribuição variam muito de acordo com a época do ano e a temperatura das águas (SANTOS, 2012). O peixe pode ser capturado por carretilha ou anzol e ocasionalmente com redes de cerco, o dourado é altamente apreciado na pesca esportiva por seu caráter feroz e agilidade, também é bastante apreciado na gastronomia devido ao sabor de sua carne (SANTOS, 2012).

Figura 2: Distribuição Geográfica do *Coryphaena hippurus* (dourado do mar) no mundo.



Fonte: FAO (Organização das nações unidas para agricultura e alimentação).

No Brasil a ocorrência do dourado do mar segue o mesmo padrão das outras regiões do mundo, quando a temperatura oceânica se eleva uma maior quantidade de cardume de dourado é vista e capturada no litoral brasileiro. A maior ocorrência acontece entre os meses de agosto a dezembro (OXENFORD, 1999).

3.2 Biotecnologia Marinha

O ambiente marinho apresenta uma fantástica reserva de compostos com características naturais únicas e diferentes, o que faz desse ecossistema ainda pouco conhecido uma das principais fontes de recursos biotecnológicos (BARRETO et al., 2014). Os processos biotecnológicos associados aos compostos extraídos do ambiente marinho são muito diversos, vão desde a produção de cosméticos e medicamentos, como por exemplo: a partir da esponja do mar são produzidos alguns antibióticos conhecidos (eritromicina, rapamicina) (ESTEVES et al., 2014). As toxinas das Cianobactérias são fontes de compostos com função fotoprotetora e anticancerígenas (VASCONCELOS, 2014).

A utilização de organismos marinhos para melhoramento biotecnológico vem ganhando destaque e vão desde o melhoramento genético desses peixes para

maior produção e maior resistência a pragas na aquicultura, como também fontes de macromoléculas utilizadas nos processos industriais (TURRA et al., 2010)

Entre as atuais fontes de recursos biotecnológicos os animais marinhos estão adquirindo destaque, os resíduos orgânicos produzidos pela indústria de pesca, principalmente as vísceras, que anteriormente eram jogados no lixo, hoje são utilizados como fontes de macromoléculas com potenciais biotecnológicos (HOMAEI et al., 2016).

3.3 Enzimas e Biotecnologia

3.3.1 Enzimas

A descoberta das enzimas aconteceu no século XVIII, com os estudos de digestão de alimentos realizados por Jons Jakob Berzelius. Ele percebeu que algumas substâncias aceleravam as reações químicas. Atualmente sabe-se que essas substâncias são as enzimas e elas funcionam como catalisadores biológicos. Esses catalisadores biológicos aceleram a velocidade da reação, e a maioria das enzimas tem origem proteica, contudo também há enzimas de RNA (Ribozimas) (SHAHIDI et al., 2001).

As enzimas apresentam características fundamentais: são extremamente específicas, são muito eficientes a ponto de catalisar reações com intensidade 100 milhões a 10 bilhões de vezes mais rápidas do que uma reação sem enzima e estão sujeitas a controles celulares (MONTEIRO et al., 2009). As enzimas são classificadas em seis classes, de acordo com a reação por elas catalisada, como descreve a tabela 1.

Tabela 1: Classificação das enzimas e suas respectivas funções.

Classes de Enzimas		
Classe 1	Oxirredutases	Catalisam reações de oxiredução, transferindo elétrons, hidretos (H-) ou protons (H+)
Classe 2	Transferases	Transferem grupos químicos entre moléculas
Classe 3	Hidrolases	Utilizam a água como receptor de grupos funcionais de outras moléculas
Classe 4	Liasas	Formam ou destroem ligações duplas, respectivamente, retirando ou adicionando grupos funcionais.

Classe 5	Isomerases	Transformam uma molécula em seu isômero.
Classe 6	Ligases	Formam ligações químicas por reações de condensação, consumindo energia sob a forma de ATP.

Fonte: (ORLANDELLI et al., 2012).

3.3.2 Enzimas na biotecnologia

São várias as aplicações de enzimas em processos industriais, entre elas: indústria têxtil, farmacêutica, de alimentos, papel e limpeza. O mercado mundial de proteases representa 60% do mercado de enzimas (Jellouli et al., 2009). É esperado um aumento na utilização de enzimas nos processos industriais devido à alta eficiência, a agilidade e serem ambientalmente sustentáveis (MONTEIRO et al., 2009).

As fontes de enzimas utilizadas nos processos industriais são vegetais, animais e microrganismos. A recombinação gênica também está sendo utilizada no desenvolvimento de enzimas mais eficientes e em maior quantidade. Além das proteases outras hidrolases, como a celulase e a lipase, têm recebido enorme interesse na aplicabilidade, bem como a utilização de etapas menos onerosas, como por exemplo, a pré-purificação de enzimas com sulfato de amônio ou solventes orgânicos.

A celulase é uma enzima que degrada celulose um polissacarídeo com ligações glicosídicas do tipo beta 1-4, ela está envolvida em vários processos: degradação de materiais lignocelulósicos, desintoxicação de resíduos agroindustriais, indústria têxtil, fabricação de ração animal, indústria de bebidas, tais como cerveja, vinhos e sucos, indústria de papel e na produção de biocombustíveis (VILELA, 2013).

As lipases são enzimas pertencentes à classe das hidrolases, elas atuam na hidrólise de óleos e gorduras, transformando o triacilglicerol em ácidos graxos e glicerol e em baixas concentrações de água são capazes de sintetizar moléculas, a chamada esterificação e transesterificação, esses dois processos também são utilizados na indústria (MOURA et al., 2012).

Na indústria, as lipases exercem várias funções, na indústria alimentícia está envolvida na obtenção de ácidos graxos livres a partir da hidrólise de óleos e

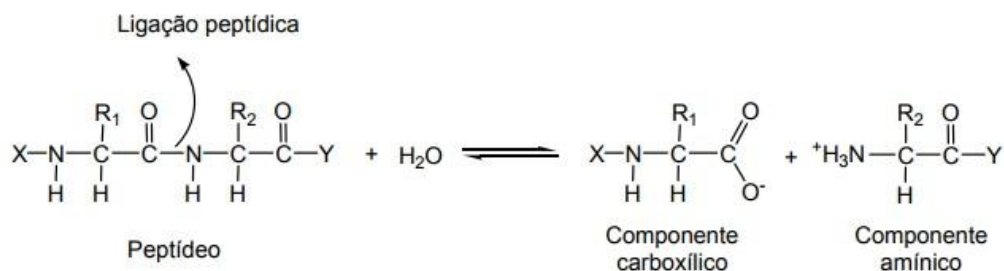
gorduras presentes em diversos alimentos. São utilizadas para hidrolisar a gordura do leite e para acelerar a maturação de queijos e obter margarinas de baixo valor calórico. Na indústria de cosméticos e perfumaria são empregadas para desenvolver emulsificantes, aromas, surfactantes e emolientes, entre outros processos (CARVALHO, 2012).

3.4 Proteases

As proteases são enzimas proteolíticas pertencentes a classe das hidrolases, catalisam reações de hidrólise transferindo componentes do substrato para a água. Essas enzimas clivam as ligações peptídicas em regiões específicas do substrato, elas podem ser divididas em classes: exopeptidases e endopeptidases de acordo com a posição da ligação peptídica a ser clivada na cadeia (CARVALHO, 2012).

As exopeptidases clivam ligações peptídicas localizadas nas regiões finais da cadeia, estas ainda podem ser divididas em carboxipeptidases e aminopeptidases, as carboxipeptidases clivam ligações peptídicas a partir da região C-terminal da cadeia, e as aminopeptidases clivam ligações a partir da região N-terminal da cadeia (OLIVEIRA, 2008).

Figura 3: Esquema ilustrativo da quebra da ligação peptídica.



Fonte: VIEIRA, 2007

As endopeptidases são enzimas que clivam nas regiões internas da cadeia polipeptídica, estas também podem ser subdivididas de acordo com o grupo de aminoácidos envolvidos no sítio ativo: serino proteases, que tem o aminoácido serina envolvido no sítio ativo da enzima (FEDATTO, 2004).

As proteases atuam na reciclagem de proteínas intracelulares, estas quando atingem seu tempo de vida útil ou apresentam envelhecimento inadequado são marcadas com outras proteínas chamadas de ubiquitina e são encaminhadas para os proteossomos, locais onde as proteínas sofrem hidrólise, os aminoácidos provenientes dessa hidrólise são reaproveitados na síntese de novas proteínas (LI et al., 2013).

Outra função importante das proteases é a digestão de alimentos proteicos, essas enzimas são conhecidas pela sua capacidade de degradar proteínas da dieta em peptídeos e aminoácidos livres que serão absorvidos pelas células digestivas (NELSON e COX, 2014). A digestão proteica mediada por proteases é comum à maioria dos animais. Nos mamíferos para que ocorra à digestão proteica uma cascata de eventos é ativada, iniciando pela alimentação, a ingestão de alimentos ricos em proteínas chega até o estômago onde é liberado o hormônio gastrina estimulando as células G do estômago a liberar HCl, acidificando o meio. Essa acidificação do meio ativam as primeiras proteases, as pepsinas que hidrolisam as proteínas na região aminoterminal de aminoácidos aromáticos (DOCKRAY, 2004).

O bolo alimentar é encaminhado para a primeira porção do intestino delgado (duodeno), o pH ácido no duodeno estimula a secreção do hormônio secretina e o pâncreas libera bicarbonato de sódio para neutralizar o pH ácido proveniente do estômago. A presença de aminoácidos livres no intestino estimula a liberação da colecistocinina pelas células endócrinas do intestino proximal (NELSON e COX, 2014). Com a secreção da colecistocinina há a liberação dos zimogênios das enzimas digestivas pelas células exócrinas do pâncreas, o tripsinogênio, quimiotripsinogênio e a procarboxipeptidase A e B. No intestino o tripsinogênio é convertido em tripsina pela ação da enteropeptidase, uma enzima proteolítica também excretada pelas células intestinais. A tripsina ativa catalisa a conversão do quimiotripsinogênio e da procarboxipeptidase A e B, como também ativam outros tripsinogênios (NELSON e COX, 2014).

Com as enzimas digestivas ativas, ocorre a maior degradação das proteínas da dieta e a maior absorção de aminoácidos. Essa cascata de eventos digestivos não é comum apenas aos mamíferos, mas ocorrem em outras classes de animais, como em peixes (GUILLÉN et al., 2017). As proteases de peixes são bem parecidas

estruturalmente com as proteases de mamíferos, contudo algumas modificações podem ocorrer em razão do hábitat do animal, as quais condições alimentares ele está exposto (GUILLÉN et al., 2017). É por essa razão que as proteases de peixes vêm ganhando destaque, pois apresentam características importantes, como a alta estabilidade térmica e à variação de pH. Enzimas com essas características são importantes para alguns processos industriais. (MONTEIRO et al., 2009).

As proteases estão entre os três maiores grupos de enzimas industriais, sendo responsável por 60% da venda internacional de enzimas (ALMONTE et al., 2011). As proteases estão envolvidas em diversos processos na indústria, entre eles estão: no processamento de couro, como aditivos nos detergentes sejam eles líquidos ou em pó, na produção de queijos, na produção de fármacos, entre outros (LI et al., 2013). A indústria de detergentes é a indústria que mais utiliza proteases atualmente, sua utilização começou em 1960, com a enzima da bactéria *Bacillus licheniformis* a subtilisinas. A boa compatibilidade da enzima com os detergentes estimulou o desenvolvimento de detergentes com enzimas em todo mundo (SAEKI et al., 2007). A busca por novas proteases para utilização como aditivos nos detergentes ganhou destaque, mas elas eram facilmente inativadas por oxidantes químicos. A descoberta de uma serino protease resistente à oxidação por agentes químicos permitiu os avanços na substituição por catalisadores biológicos (SAEKI et al., 2007).

A indústria de alimentos explora o uso das proteases de várias maneiras, elas são bastante utilizadas na preparação de hidrolisados de proteínas de alto valor nutricional, os hidrolisados de proteínas tem um papel importante na regulação da pressão arterial e são utilizados em formulações de alimentos infantis e na dieta. O soro de queijo é um subproduto abundante na indústria de laticínios, utilizando proteases houve a produção de hidrolisados da proteína do soro (GUPTA et al., 2002).

Na indústria farmacêutica o uso de proteases em vários processos é promissor, o mercado de enzimas é considerado o mais promissor para as indústrias farmacêuticas. As proteases são utilizadas em diversos processos terapêuticos, a plasmina utilizada como agente fibrinolítico, cicatrizantes de feridas. A papaína que

auxilia na digestão de proteínas em pacientes com dispepsia crônica e gastrite, a tripsina auxilia na digestão (MONTEIRO et al., 2009).

Na indústria têxtil as proteases são utilizadas para impedir o encolhimento do tecido e fazer biopolimento, elas também são utilizadas para facilitar o manuseio melhorar e aumentar a qualidade da fibra da seda (MONTEIRO et al., 2009).

Entre as proteases, as tripsinas pertencentes à classe das serino-proteases e têm ganhado destaque em muitos processos industriais, elas já são utilizadas na indústria farmacêutica, na de detergentes, entre outras.

3.5 Serino Proteases

No genoma humano cerca de 2-4% dos genes codificam para proteases, dos quais 30% são serino proteases ou homólogos de serino proteases. Estas enzimas estão envolvidas em vários processos fisiológicos importantes, como: digestão de proteínas, coagulação sanguínea, fibrinólise, imunidade humoral e celular, transdução de sinal, ativação de hormônios (PAGE e DI CERA, 2008). As serino proteases são caracterizadas pela presença de um resíduo de serina e histidina e aspartato no sítio ativo. Uma série de outras famílias de enzimas, como as asparaginase, esterases, acilases e beta lactamases utilizando uma tríade catalítica idêntica para gerar forte ataque nucleofílico (PAGE e DI CERA, 2008).

Outras serino proteases mediam a catálise através de novas tríades de resíduos, como a Histidina combinada com a serina. Em quase todos os casos, o sítio ativo de serina pode ser inibido por PMSF (fenilmetilsulfonilfluoreto) e DFP (Diisopropil fluorofosfato), sendo um teste rápido utilizado para identificar proteases do tipo serino proteases (REIS, 2009).

A família das serino proteases é bastante variada, mas apresenta em comum o resíduo do aminoácido serina na tríade catalítica. Abaixo segue uma tabela com as principais enzimas que pertencem a família das serino proteases.

Tabela 2. Exemplos das principais enzimas da família das serino proteases

Enzimas	Resíduos catalíticos
Tripsina	His, Asp, Ser
Subtilisina	Asp, His, Ser
Prolyl oligopeptidase	Ser, Asp, His

D-ala-D-ala carboxypeptidase	Ser, Lys
LexA peptidase	Ser, LYs/His
Cytomegalovirus assemblin	His, Ser, His
Lon peptidase	Ser, lys
Clp peptidase	Ser, His, Asp
Nucleoporin	His, Ser
Aminopeptidase DmpA	Ser
Lactoferrin	Lys, Ser
L,D-Carboxypeptidase	Ser, Glu, His
Rhomboid	His, Ser

Fonte: Page, Di cera, 2008

3.6 Tripsina

As serino proteases digestivas podem ser divididas em três principais tipos: tripsina, quimiotripsina e elastase. A tripsina é uma enzima digestiva secretada pelas células exócrinas do pâncreas na forma de zimogênios (tripsinogênio) e ativada pela ação da enteropeptidase intestinal quando cliva o tripsinogênio nos resíduos 15 (lisina) e 16 (isoleucina) (ALMAZÁN et al., 2008).

A quimiotripsina também é secretada pelas células exócrinas do pâncreas, seu zimogênio é a quimiotripsinogênio este tem especificidade para ligações peptídicas contendo resíduos de aminoácidos hidrofóbicos na cadeia lateral, como a fenilalanina (Phe), Tirosina (Tyr) e Triptofano (Trp). A capacidade da tripsina e da quimiotripsina em hidrolisar proteínas deve ter surgido no início da evolução, pois genes que codificam para tripsinas foram encontrados em genomas bacterianos. Os organismos primitivos eram capazes de utilizar uma proteína primitiva como fonte de aminoácidos para a síntese de enzimas (ALMAZÁN et al., 2008).

Com a evolução uma importante característica foi desenvolvida pelos organismos, a regulação na atividade, expressão e síntese de tripsinas e quimiotripsinas. Devido sua capacidade de hidrólise proteica, essas enzimas são armazenadas na sua forma inativa, com o objetivo de proteger o tecido da hidrólise proteica (BEZERRA et al., 2001). Na figura 4 está ilustrada a estrutura tridimensional do tripsinogênio e da tripsina ativa, bem como os sítios de clivagem da enteropeptidase e dois tipos de tripsinas alfa e beta (ELGENDY et al., 2016).

No pâncreas humano há três isoformas de tripsinogênio que são excretadas: catiônica, aniônica e o mesotripsinogênio resistente ao inibidor. Porém apenas os tripsinogênios catiônico e aniônico são predominantes, o mesotripsinogênio é encontrado apenas vestígios. Mutações no gene que codifica o tripsinogênio catiônico está associado a pancreatite crônica, devido a auto-ativação do tripsinogênio ainda no pâncreas (ELGENDY et al., 2016).

3.7 Sistema Digestório de Peixes

Assim como nos mamíferos, nos peixes há produção de enzimas digestivas no estômago e no pâncreas, no estômago encontra-se a protease ácida pepsina que também é liberada na sua forma inativa pepsinogênio e pela acidez do estômago é ativada em pepsina. As proteases alcalinas que são produzidas pelo pâncreas dos mamíferos, nos peixes muitas vezes são produzidas e excretadas pelo ceco-pilórico, pois o pâncreas é difuso (BEZERRA et al., 2001). As proteases alcalinas atuam em pH básico, alcalino, próximo a 8,0, o pH é muito importante para essas enzimas sejam ativadas e exerçam sua atividade hidrolítica.

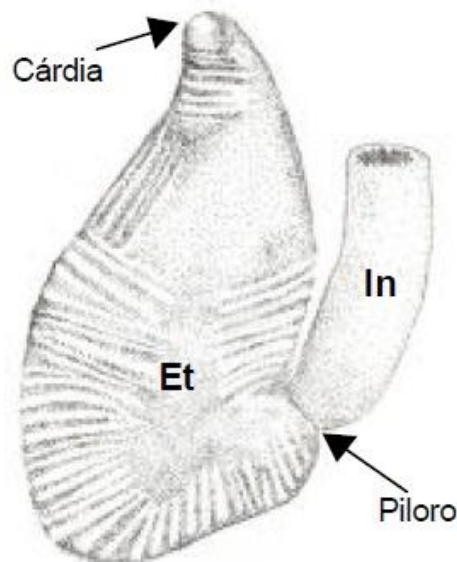
O sistema digestório de peixes difere dos mamíferos, principalmente devido ao hábito alimentar e ao ambiente, o que pode influenciar a presença, posição, formato e tamanho de um órgão em particular. Essas são variações morfológicas provocadas pelo ambiente, podendo ser de caráter permanente quando são produzidas pela evolução ou de caráter temporário, como no caso de adaptações daquele momento ou período. Modificações temporárias podem ser decorrentes de escassez de um determinado alimento naquela época ou região ou pode estar relacionada à fase de desenvolvimento dos peixes. Muitas vezes na fase larval há um hábito alimentar e na fase adulta outro hábito alimentar (ROTTA, 2003).

Os peixes podem ser divididos em 3 categorias de acordo com o hábito alimentar: Herbívoros, Onívoros e Carnívoros. Os herbívoros se alimentam de algumas espécies de plantas, e possuem estruturas especializadas de mastigação. Os onívoros se alimentam de itens de origem vegetal e animal, podem se alimentar de invertebrados, peixes pequenos, plantas. E os carnívoros se alimentam de itens de origem animal, podem consumir invertebrados e outros peixes.

Os peixes não utilizam a cavidade bucal para a mastigação e pré-digestão, como ocorre nos mamíferos, ela se limita a selecionar, prender e conduzir o alimento até o esôfago. Os peixes possuem dentes, a diferença na dentição indica a preferência alimentar, os quais variam de tamanho, dureza e textura. Acredita-se que os dentes dos peixes são originados de escamas que recobriam os lábios. A maioria dos peixes carnívoros utilizam os dentes apenas para segurar a presa e a engolir inteira, com exceção da piranha que tem o mecanismo de dilacerar o alimento antes da deglutição (ROTTA, 2003).

O estômago de peixes possuem três partes, a entrada (cárdica), saco (fúndica) e saída (pilórica). Nos peixes carnívoros as glândulas gástricas são mais desenvolvidas, e se alimentam com menor frequência, necessitando de um estômago maior com musculatura elástica para acomodar as presas ingeridas, o que permite sua distensão podendo aumentar de três a quatro vezes o seu tamanho. Na figura 4 está ilustrado o estômago de um peixe carnívoro, destacando suas principais divisões.

Figura 4: Desenho ilustrativo do estômago de peixe carnívoro, (Et = estômago, In = Intestino).



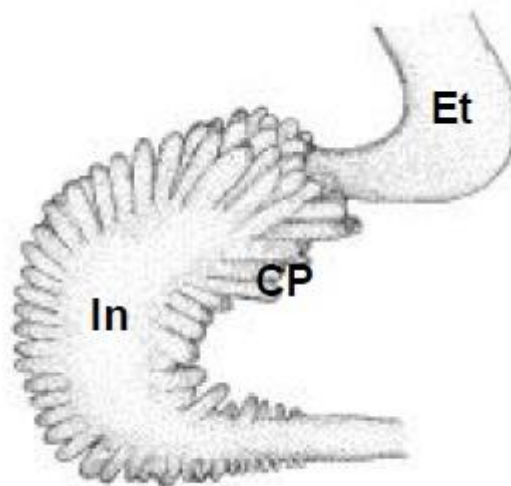
Fonte: Embrapa, 2003.

O intestino dos peixes é um tubo relativamente simples, começando pela válvula pilórica e terminando no reto, nos Teleósteos há a presença de pelo menos

dois segmentos, na anterior ocorrem a absorção de nutrientes (monossacarídeos, aminoácidos e ácidos graxos), e na segunda parte ocorre a entrada de macromoléculas por pinocitose (ROTTA, 2003).

Alguns peixes apresentam uma estrutura que parece ser uma extensão do intestino, o ceco-pilórico, que pode ser mais desenvolvido em algumas espécies de peixes, dependendo do seu hábito alimentar, peixes carnívoros têm cecos-pilóricos mais bem desenvolvidos. Essa estrutura funciona para aumentar a superfície de contato dos alimentos (CAL, 2006).

Figura 5: Desenho ilustrativo do intestino de peixe carnívoro (In = Intestino, CP = Ceco-pilórico e Et = Estômago).



Fonte: Embrapa, 2003

O reto é diferenciado do intestino médio pela diminuição da vascularização e do número de células secretoras, tem parede muscular muito mais grossa que a do intestino e com uma grande capacidade de distensão (ROTTA, 2003).

3.8 Tripsina de peixes

As tripsinas são enzimas digestivas que são liberadas no intestino, nos teleósteos o intestino possui dobras profundas nas suas paredes intestinais de onde as células secretoras se formam e liberam as secreções ricas em enzimas digestivas (proteases, lipases e carboxilases) (CHACON et al., 2011).

As tripsinas e quimiotripsinas são as enzimas mais secretadas na porção anterior do intestino, a ação dessas enzimas também pode ocorrer no ceco-pilórico quando presente (CHACON et al., 2011). A tripsina é uma serino-protease que varia entre 22 a 30 kDa em peixes e clivam as regiões C-terminais de ligações peptídicas que contenham resíduos de arginina e lisina (SILA et al.,2012). Na figura 6, é possível verificar a estrutura tridimensional da tripsina do Salmão (Protein data bank).

Figura 6: Imagem da estrutura tridimensional da tripsina do Salmão.



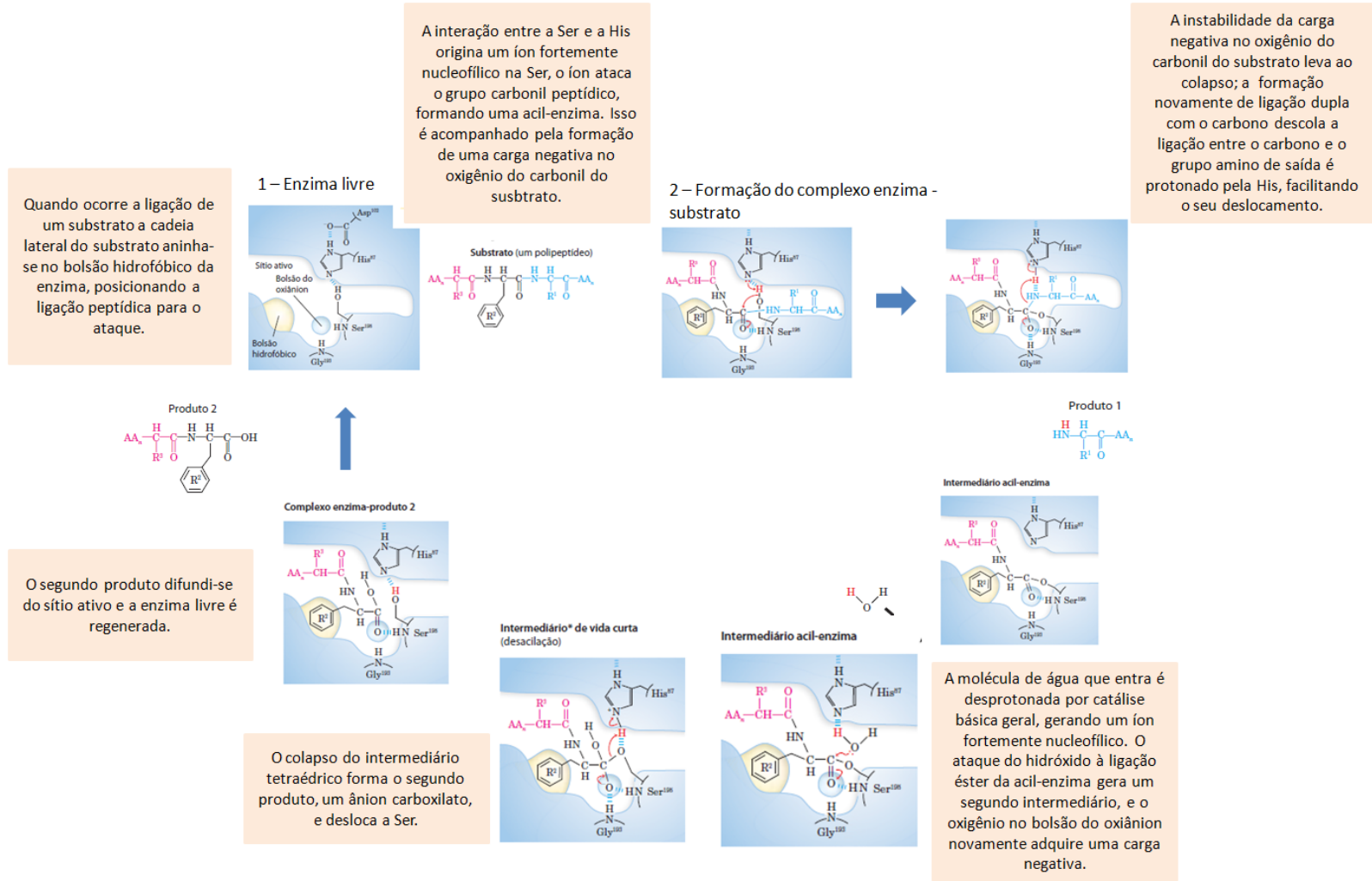
Fonte: <https://goo.gl/17USHA>

A imagem da estrutura tridimensional da tripsina do Salmão apresenta algumas estruturas que se destacam, por exemplo: as setas que são representações da estrutura secundária da proteína folha β , as alfa hélices são representadas por essas torções em forma de hélice, ainda é possível visualizar na imagem os loops que são estruturas de conexões entre as alfa hélices e as folhas β . O arranjo dessas estruturas ocorre de acordo com a sequência de aminoácidos, a estrutura primária, que irá permitir as interações entre os resíduos de aminoácidos, o número maior de interações que a proteína fizer será a estrutura nativa da proteína. Em relação as enzimas, será a estrutura que ela exercerá melhor sua atividade catalítica.

Na imagem é possível observar pequenas estruturas interna e externamente a molécula, apontadas com a seta em azul. Outras moléculas também podem interagir com a enzima, como exemplos íons metálicos que atuam aumentando ou diminuindo sua atividade catalítica.

O mecanismo de ação da tripsina (figura 7) ocorre em algumas etapas: o acoplamento do sítio ativo da enzima ao substrato através de um ataque nucleofílico promovido pelo resíduo de serina ao grupo carbonila da ligação peptídica do substrato. Este ataque nucleofílico irá instabilizar o oxigênio do grupo carbonila, ganhando uma carga negativa por um curto período que é estabilizada pelo hidrogênio do bolsão oxiânion. Isto levará ao colapso do intermediário tetraédrico e a formação do complexo acil-enzima. O grupo amino irá se dissociar da cadeia formando o primeiro da hidrólise e a água entrará no sítio ativo para promover um ataque nucleofílico promovendo a formação de um novo complexo acil-enzima para dissociação do grupo carboxil, o segundo produto da hidrólise (HEDSTROM, 2002).

Figura 7: Mecanismo de ação da tripsina.



Algumas tripsinas de peixes apresentam características específicas, entre elas estão estabilidade térmica e a estabilidade em pH variados, isso ocorre por que os peixes são animais ectotérmicos, ou seja, incapazes de regular sua temperatura corporal, dessa forma dependem da temperatura do meio, o que pode influenciar na adaptação dessas macromoléculas (BEZERRA et al., 2001). As características específicas das tripsinas de peixes permite que elas ganhem maior espaço na utilização de processos industriais.

3.9 Utilização de resíduos orgânicos como fonte de enzimas

É evidente que a substituição dos catalisadores químicos por catalisadores biológicos (enzimas) é crescente, devido principalmente aos menores danos causados a saúde e por serem biodegradáveis. As fontes de enzimas também são diversas, porém o desafio de reduzir o custo de obtenção de enzimas e a descoberta de enzimas com alto potencial biotecnológico é muito alto. Essas fontes também precisam obedecer à busca da utilização de recursos sustentáveis, principalmente depois da assinatura da agenda 30, onde vários países assinaram o acordo de erradicação da pobreza em todas as suas formas e dimensões, incluindo a pobreza extrema com a utilização de recursos de forma sustentável (Agenda 2030).

A aquicultura representa uma alternativa para o aumento da produção de alimentos em todo mundo, bem como a busca pelo estilo de vida mais saudável, com o aumento no consumo de peixes e derivados. Esse aumento seja pela aquicultura, seja a pesca extrativista, o consumo de peixes produz cerca de 30% de resíduos sólidos orgânicos (FELTES et al., 2009). Os quais geralmente não são adequadamente manejados, podendo trazer uma série de problemas ambientais, como a contaminação do solo e de corpos d'água (VIDOTTI et al., 2016).

Dessa forma há uma necessidade crescente em montar sistemas de aproveitamento de resíduos nas indústrias, para maior aproveitamento econômico e preservação ambiental (ARRUDA, 2004). Entre as atividades feitas com os resíduos orgânicos estão à produção de ração animal, produção de fertilizantes e produtos químicos (FELTES et al., 2009). Contudo há um interesse crescente em utilizar os resíduos orgânicos de peixes para uma maior diversificação das atividades da indústria desta área e a obtenção de subprodutos com valor agregado, entre as

alternativas encontradas está a extração de enzimas com potenciais biotecnológicos que são utilizadas como catalisadores biológicos.

A busca por enzimas com alta capacidade biotecnológica é grande, e as vísceras de peixes correspondem fontes limpas e alternativas para a extração dessas macromoléculas. Isso seria possível com parcerias entre a indústria de pesca e a indústria de enzimas, para o desenvolvimento de produtos de alto valor comercial e a resolução do problema do destino dos resíduos orgânicos produzidos pela indústria pesqueira.

Vários peixes já foram submetidos a estudos para avaliar as enzimas produzidas por eles, tanto o estômago como os cecos pilóricos e o intestino corresponde fontes de importantes enzimas. Esses estudos permitiram determinar a possibilidade de recuperar grandes quantidades de enzimas a partir de resíduos de peixes, a exemplo do resíduo proveniente do Tambaqui, onde 1g de enzima é recuperada de 1 kg de ceco pilórico (BEZERRA et al., 2001). E 1 kg de intestino de bacalhau produz 1g de tripsina (ESPÓSITO et al., 2009). A biotecnologia é capaz de fornecer os meios para transformar tais matérias-primas em produtos valiosos, como enzimas (ESPÓSITO et al., 2009).

3.10 Purificação de Proteínas

Para iniciar o trabalho com proteínas é fundamental que a mesma seja purificada da solução, extrato onde ela está inserida. São vários os métodos utilizados para a purificação de proteínas, esses métodos aproveitam as propriedades de cada uma dessas macromoléculas, que podem ser tamanho, carga e propriedades de ligação (NELSON e COX, 2014).

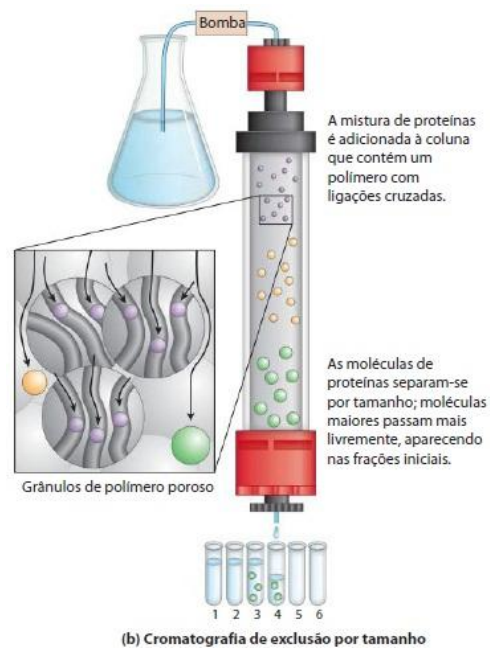
Geralmente o extrato bruto é o meio de onde vai purificar a proteína, esse extrato precisa de alguns cuidados antes de passar para as etapas de purificação, ele pode ser centrifugado para retirar partículas sólidas grandes ou submetidos a um fracionamento, que utilizam diferenças de solubilidade de proteínas, pH, temperatura e concentração de sais para separar a proteína de interesse de contaminantes (NELSON e COX, 2014).

São vários os tipos de fracionamento utilizado para purificar proteínas, como precipitação utilizando sulfato de amônio, acetona, etanol, entre outros. A escolha do

tipo de fracionamento depende muito do tipo de proteína que esta sendo purificada. A etapa de fracionamento é muito importante, pois permite retirar grandes quantidades de contaminantes do extrato bruto e concentrar a proteína de interesse em uma única fração. A diálise, outra técnica utilizada na purificação de proteínas, onde a proteína de interesse é separada de solutos menores quando inserida em uma membrana de diálise com poros de tamanhos conhecidos e adicionados em uma solução (água, tampão). Os solutos que são menores que os poros da membrana saem e as proteínas que são maiores ficam retidas dentro da membrana, essa técnica é muito utilizada para remover sal de uma solução (NELSON e COX, 2014).

As técnicas cromatográficas são as principais formas de obtenção de proteínas puras, os três principais tipos de cromatográficas são: filtração em gel que separa as proteínas de acordo com tamanho, a troca iônica que separa de acordo com a diferença de cargas e a afinidade que separa através do reconhecimento biológico. Filtração em gel é um tipo de cromatográfica utilizada para separar proteínas com diferentes tamanhos, esta resina apresenta poros de tamanhos variados conhecidos e a depender do tamanho da proteína de interesse os tamanhos dos poros da resina da filtração em gel são escolhidos. A amostra é aplicada nessa resina e ela percorre os poros da resina, a velocidade com qual esse percurso é feito dependendo do tamanho das partículas. As proteínas grandes são liberadas no início da corrida cromatográfica, visto que as mesmas não conseguem entrar nos poros pequenos da resina e as proteínas e solutos pequenos tem sua saída retardada pela passagem dos poros da resina, como mostra a figura 8.

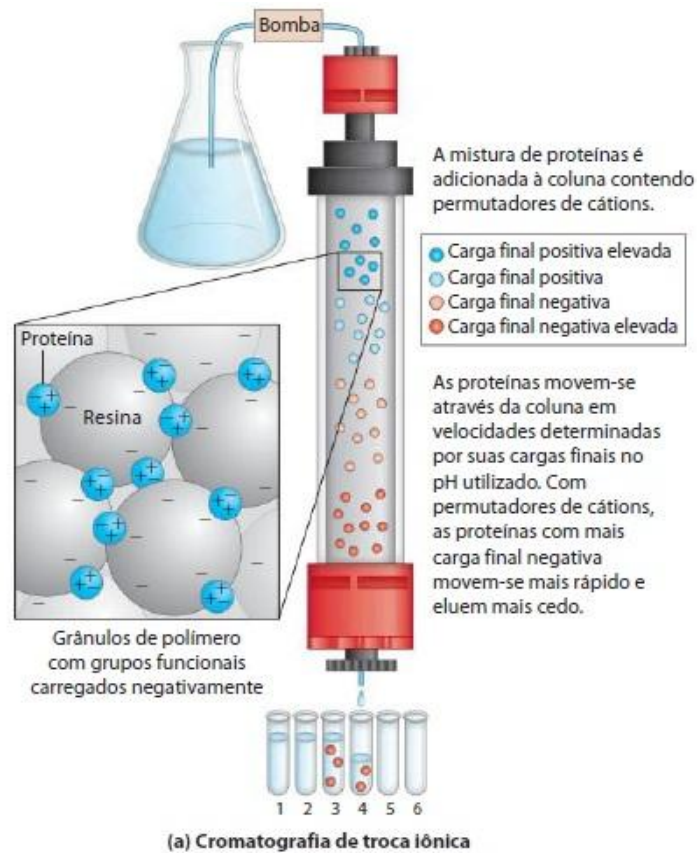
Figura 8: Esquema ilustrativo da cromatografia de filtração em gel (exclusão por tamanho).



Fonte: (NELSON e COX, 2014).

A cromatografia de troca iônica se baseia na diferença entre as cargas das proteínas em determinados pH, a matriz na coluna também chamada de resina contém grupos carregados ligados, aqueles ligados a grupos aniônicos são chamados de permutadores de cátions e aqueles ligados a grupos catiônicos são chamados de permutadores de ânions. A afinidade da proteína aos grupos carregados na resina depende do pH, o que determina o estado de ionização da proteína. A separação ou a eluição da proteína pode ocorrer variando o pH ou a concentração de sal da fase móvel de modo a criar um gradiente de concentração de sal ou pH (NELSON e COX, 2014). Uma das vantagens de utilizar uma resina de troca iônica é a capacidade de utilizar amostras diluídas e em grandes volumes, pois esse tipo de resina concentra a amostra e tem capacidade alta. Na figura 9 é possível visualizar um esquema ilustrativo da cromatografia de troca iônica.

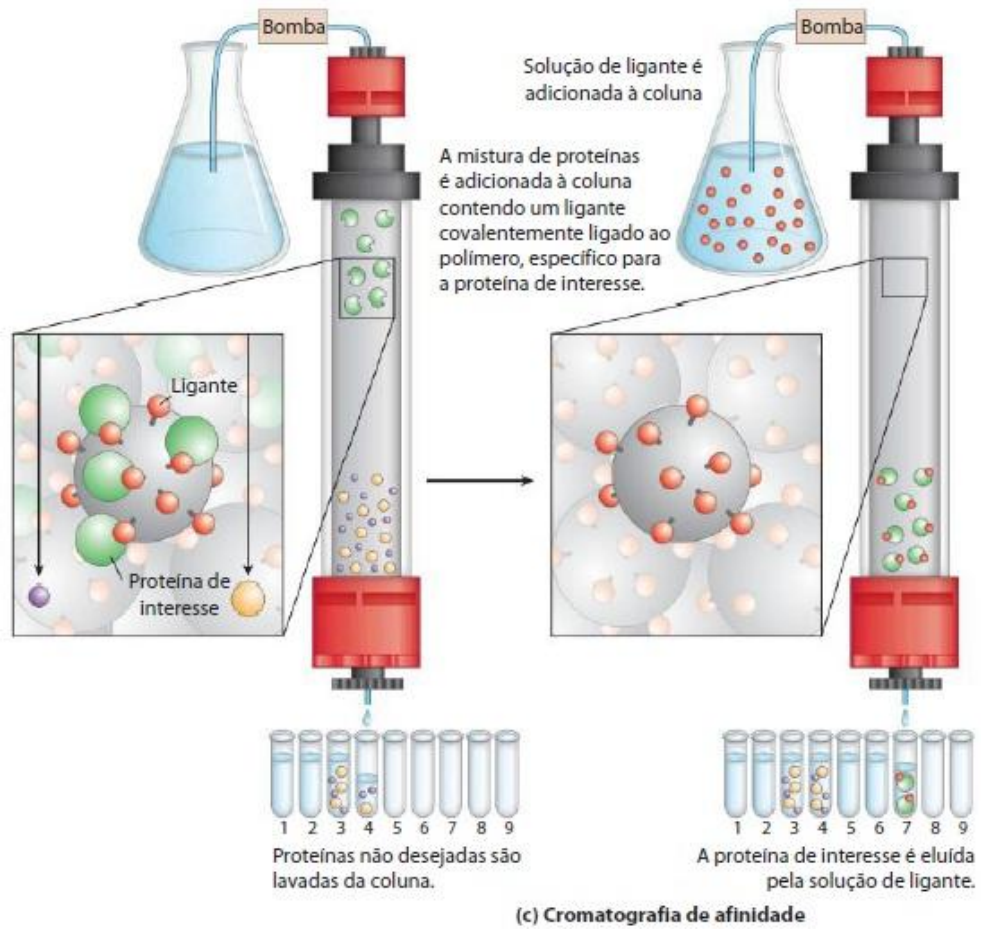
Figura 9: Esquema ilustrativo da cromatografia de troca iônica.



Fonte: (NELSON e COX, 2014).

A cromatografia de afinidade é aquela apresenta melhor resolução entre as três cromatografias analisadas, isso é devido à alta especificidade dessa cromatografia. Seu princípio é baseado no biorreconhecimento, a resina tem um grupo químico ligado covalentemente quando uma amostra é aplicada na coluna a proteína ou macromolécula que tem afinidade ao ligante é ligado e tem sua eluição retardada. Para purificação de tripsina é comum à construção de colunas de afinidade com inibidores de tripsina ligados a resina, como por exemplo, a benzamidina e quando a amostra contendo a tripsina passa pela resina a mesma fica ligada aos inibidores e tem sua eluição retardada (NELSON e COX, 2014).

Figura 10: Esquema ilustrativo da cromatografia de afinidade.



Fonte: (NELSON e COX, 2014).

A escolha do tipo de cromatografia a ser utilizada para purificar uma proteína depende muito do tipo de amostra e do pesquisador, muitas vezes é necessário utilizar mais de um tipo de cromatografia, para obter a proteína purificada.

4 METODOLOGIA

4.1 Obtenção das Vísceras e Preparação do Extrato Bruto

As vísceras do *Coryphaena hippurus* (dourado do mar) foram obtidas de peixes pescados na praia de Ponta Verde, Maceió-AL nos meses de Agosto e Setembro de 2016. As atividades foram previamente aprovadas pelo Comitê de Ética no uso de animais (Protocolo 64/2016). As vísceras foram encaminhadas em caixas térmicas com gelo até o Laboratório de Metabolômica e Proteômica da Universidade Federal de Alagoas (LAMP/UFAL), onde foram congeladas em freezer -20°C para posteriores análises.

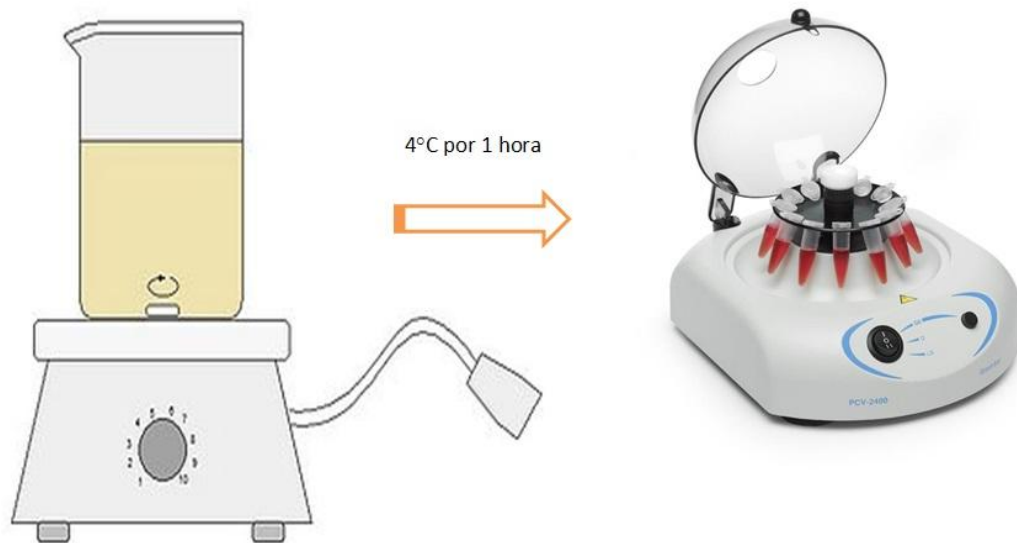
Os órgãos foram separados das vísceras, pesados e macerados utilizando tesouras e homogeneizador *politron* em tampão Tris-HCl a 50 mM pH 8,0 (Tampão de extração) em uma proporção de 2 g/mL. Foi realizado teste de atividade específica através da hidrólise do substrato BApNA (N α -Benzoil-D,L-arginina-4-nitroanilida) 50 mM para verificar a presença de tripsina, o produto da reação é o p-nitroanilina, de coloração amarelada esta foi monitorada a 410 nm em espectrofotômetro. O tecido que apresentou maior atividade sobre o substrato específico para tripsina, o BApNA, foi submetido à centrifugação por 15 minutos a 15.000g a 4° C, o sobrenadante foi determinado como extrato bruto.

4.2 Fracionamento Salino (*Salting out*)

O extrato bruto foi submetido ao fracionamento com sulfato de amônio (0-20, 20-40, 40-60, 60-80 e 80-100%) sob agitação e banho de gelo, após a adição do sal a amostra foi incubada a 4°C por 1 hora. Entre cada ciclo a amostra foi centrifugada a 15.000g a 4°C por 15 minutos e o precipitado ressuspendido em tampão Tris-HCl 50 mM pH 8,0 e armazenado em geladeira a 4°C (Figura 11).

Todas as frações foram submetidas a teste de hidrólise enzimática do substrato BApNA. Para a reação enzimática as frações foram diluídas 100x e 10 μ L da fração diluída foi adicionado a 390 μ L de tampão de extração com 100 μ L de solução reveladora (4 μ L de BApNA a x μ M + 96 μ L de tampão de extração), a reação foi incubada por 30 minutos a 37°C e após o período de incubação a reação foi encerrada com 500 μ L ácido cítrico 20% (m/v) e analisado em espectrofotômetro a 410 nm, todas as reações foram realizadas com controle negativo (branco).

Figura 11: Esquema ilustrativo do fracionamento salino (*salting out*).



4.3 Cromatografia de Filtração em Gel

A fração do fracionamento salino com maior atividade foi aplicada em coluna de filtração em Gel S-100 HR (50 mL) acoplada a um cromatógrafo líquido AKTA *pure* M1 (GE), previamente equilibrada com tampão Tris-HCl 50 mM pH 8,0 com 0,5 M de NaCl. O fluxo durante a cromatografia foi de 0,1 mL/min. As frações coletadas foram analisadas através de reação enzimática por hidrólise do BApNA, 10 μ L da fração + 390 μ L de tampão (Tris-HCl 50 mM pH 8,0) e 100 μ L de solução reveladora (4 μ L de BApNA e 96 μ L de tampão A) por 30 minutos a 37°C e encerrada com 500 μ L de ácido cítrico 20% (m/v). As frações que apresentaram atividade específica para o BApNA foram analisadas quando ao perfil de bandas em Eletroforese de gel de poliacrilamida.

4.4 Cálculo de unidades enzimáticas

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

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

4.5 Eletroforese SDS-PAGE 15%

As eletroforeses foram realizadas a voltagem constante (90 V), em gel de poliacrilamida com dodecil-sulfato de sódio (SDS-PAGE) a 15% (LAEMMLI, 1970). O tampão das amostras foram 0,5 M Tris-HCl pH 6,8; 2% de SDS; 10% de glicerol; 5% de 2-Mercaptoetanol; 0,001% de azul de bromofenol e aquecida por 5 minutos a 100°C. O gel foi corado com Coomassie Brilliant Blue G-250 em Água: Metanol (1:1) por 2 horas e descorado com solução descorante (50% metanol, 10% ácido acético e 40% água).

4.6 Teste de temperatura ótima e estabilidade térmica

Para verificar a temperatura ótima de atividade da enzima isolada foram realizadas reações de hidrólise do BAPNA em diferentes temperaturas (20°C a 70°C), onde foram adicionados 20 µL da enzima, com 380 µL de tampão A (Tris-HCl 50mM pH 8,0) e 100 µL de solução reveladora (4 µL de BApNA + 96 µL de Tampão A), incubado por 1 hora nas respectivas temperaturas, as reações foram encerradas com 500 µL de ácido cítrico 20% (m/v). A atividade foi analisada em espectrofotômetro a 410 nm (UV, Shimadzu 1280, Serial 01619 A 120654), todos os testes de caracterização da enzima pura foram realizados em triplicata e as reações foram analisadas no mesmo espectrofotômetro. A temperatura que apresentou maior hidrólise do BAPNA foi considerada como 100% de atividade relativa.

A estabilidade térmica foi analisada incubando a enzima em diferentes temperaturas (20°C, 30°C, 40°C, 50°C, 60°C e 70°C) por 1 hora, após o período de incubação foi adicionado 100 µL de solução reveladora (4 µL de BApNA + 96 µL de tampão) e incubado novamente por 1 hora na temperatura ótima da enzima, a reação foi encerrada com 500 µL de ácido cítrico 20% (m/v) e analisada em espectrofotômetro a 410 nm.

4.7 Teste de pH ótimo e estabilidade em pH

Para a determinação do pH ótimo, analisamos o tamponamento com maior taxa de hidrólise do substrato BApNA, os tampões escolhidos foram: Acetato de sódio (pH 4,0 a 6,0); fosfato de sódio (pH 7,0); Tris-HCl (pH 8,0); Glicina (pH 9,0 a 11,0), todos a 100 mM. A reação foi realizada adicionando 20 µL da enzima a 380 µL dos respectivos tampões acima citados e 100 µL de solução reveladora (4 µL de

BAPNA + 96 µL dos diferentes tampões) de acordo com o pH analisado. A reação foi encerrada com 500 µL de ácido cítrico 20% (m/v) e analisada em espectrofotômetro a 410 nm.

A estabilidade em pH foi analisada com os mesmos tampões descritos acima, na reação foi adicionado 20 µL da enzima e incubada por 1 hora em 100 µL dos respectivos tampões de acordo com o pH, após o período de incubação foi adicionado 376 µL tampão do pH ótimo (Tris-HCl 200mM pH 8,0) com 4 µL do substrato BAPNA para garantir que o pH da reação atingi-se o pH ótimo, a reação foi novamente incubada por 1 hora e encerrada com 500 µL de ácido cítrico 20% (m/v) e analisado em espectrofotômetro a 410 nm.

4.8 Teste de Inibição

Foram avaliados cinco inibidores: PMSF 1 mM e 5 mM, EDTA (Ácido Etilenodiamino tetra-acético) 1 mM, Benzamidina 1 mM e 5 mM, 2-Mercaptoetanol 5 mM e SBTI (Inibidor de tripsina da soja) 1 mg/mL, o controle positivo foi a reação sem a presença dos inibidores e foi considerada 100% da atividade. As reações foram realizadas incubando a enzima com os inibidores a temperatura ambiente por 30 minutos e após esse período de incubação foi adicionado 100 µL da solução reveladora (4 µL de BAPNA e 96 µL de Tampão Tris-HCl 50 mM pH 8,0) e foi incubado a 40°C por 1 hora e encerrado com 500 µL de ácido cítrico 20% (u/v). E analisado em espectrofotômetro a 410 nm.

4.9 Efeito dos íons metálicos

A atividade da tripsina purificada foi analisada quanto à influência de íons metálicos: Zn^{2+} , Cu^{2+} , Mg^{2+} , Fe^{2+} , Mn^{2+} e Ca^{2+} a 5 mM. Nas reações enzimáticas foram adicionadas 20 µL da enzima, 250 µL da solução com os metais, 130 µL de tampão Tris-HCl 100 mM pH 8,0 e 100 µL de solução reveladora (96 µL de Tampão e 4 µL de BAPNA), a reação foi incubada por 1 hora a 40° C, os resultados foram comparados com o controle positivo que não teve a presença de nenhum metal. Após o período de incubação a reação foi encerrada com 500 µL de ácido cítrico a 20% (m/v) e analisado a 410 nm em espectrofotômetro.

4.10 Zimografia

No zimograma o protocolo é o mesmo no item 4.5, porém as amostras não foram fervidas e não foi utilizado agente redutor, o gel foi polimerizado com caseína 0,2%, e após a eletroforese, o mesmo foi lavado com Triton X-100 2,5% em tampão de extração por 30 minutos sob agitação, para a retirada do SDS. Em seguida, foram adicionados 100 mL de tampão de reação (Tris-HCl 50 mM pH 8,0), permanecendo neste por 24 h a 25°C. O gel foi corado e descorado como descrito acima. O zimograma foi realizado somente após a comprovação da pureza da enzima.

4.11 Compatibilidade e Estabilidade em detergentes comerciais

A tripsina isolada foi analisada quanto a compatibilidade e estabilidade em detergentes comerciais, foram analisados 6 diferentes tipos de detergentes (Omo líquido, Tyxan Ypê líquido e pó, Ariel líquido e pó). Os detergentes foram diluídos a 7 mg/mL e aquecidos a 70°C por 1 hora para remover as enzimas endógenas, após o aquecimento a tripsina isolada do *Coryphaena hippurus* (dourado do mar) foi adicionada aos detergentes por 1 hora a temperatura ambiente. A atividade residual foi analisada em substrato caseína incorporada em gel de poliacrilamida (Zimografia), protocolo descrito no item 4.6. Também foram avaliadas a tripsina purificada também tratada com PMSF (controle negativo) e a tripsina sem tratamento (Controle Positivo).

4.12 Determinação de proteínas

A determinação da concentração de proteínas foi realizada de acordo com método de Bradford usando soro de albumina bovina (BSA).

4.13 Cinética Enzimática

A atividade da tripsina purificada foi analisada quando a curva cinética de Michaelis-Menten, a reação ocorreu em temperatura e pH ótimos da enzima com variação da concentração do substrato BA_pNA (0,015 – 6 mM) incubando por 1 hora.

5 RESULTADOS

5.1 Obtenção das vísceras e Preparação do Extrato Bruto

As vísceras do *Coryphaena hippurus* (dourado do mar) foram obtidas na praia de Ponta Verde, Maceió-AL. As vísceras foram armazenadas em gelo e encaminhadas para o laboratório de Metabolômica e Proteômica da Universidade Federal de Alagoas (UFAL). Algumas vísceras de peixes apresentam características importantes, como por exemplo, a rápida deteriorização quando não armazenada de maneira adequada o que sugere a ação de potentes proteases (KTARI et al., 2012). O dourado do mar apresenta essa característica, além de ser um peixe de hábito alimentar carnívoro, o que fortalece a hipótese de possuir importantes proteases.

O órgão que apresentou maior atividade de hidrólise do BApNA foi o intestino, a partir dele foram feitos os extratos brutos e submetidos à precipitação salina e cromatografia.

Tabela 3: Análise da atividade específica para tripsina em órgãos do *Coryphaena hippurus* (dourado do mar).

Órgãos	Quantidade (µL)	Tempo de incubação	Atividade total (U/mL)
Intestino (2 g/mL)	2 µL	30 minutos	0,359
Ceco pilórico (2 g/mL)	2 µL	30 minutos	0,085
Estômago (2 g/mL)	2 µL	30 minutos	0,047

Fonte: Elaborada pela autora.

5.2 Fracionamento Salino (*Salting out*)

O extrato bruto produzido a partir do intestino foi submetido ao fracionamento salino com sulfato de amônio diferentes frações (0-20, 20-40, 40-60, 60-80 e 80-100%).

Tabela 4: Frações do fracionamento salino e suas respectivas atividades específicas para tripsina do *Coryphaena hippurus* (dourado do mar).

Frações da Precipitação	Atividade total (U/mL)
Extrato Bruto	0,223
F 0-20%	0,158
F 20-40%	0,274
F 40-60%	0,769

F 60-80%	0,160
F 80-100	0,047

Fonte: Elaborada pela autora.

A etapa de precipitação salina foi fundamental para retirar os contaminantes do extrato bruto e para concentrar a atividade da enzima em uma única fração. São dois os parâmetros observados nessa fase, a resolução, ou seja, a capacidade de concentrar a enzima em uma única fração e a recuperação, que é a quantidade de atividade efetivamente recuperada a partir do extrato bruto.

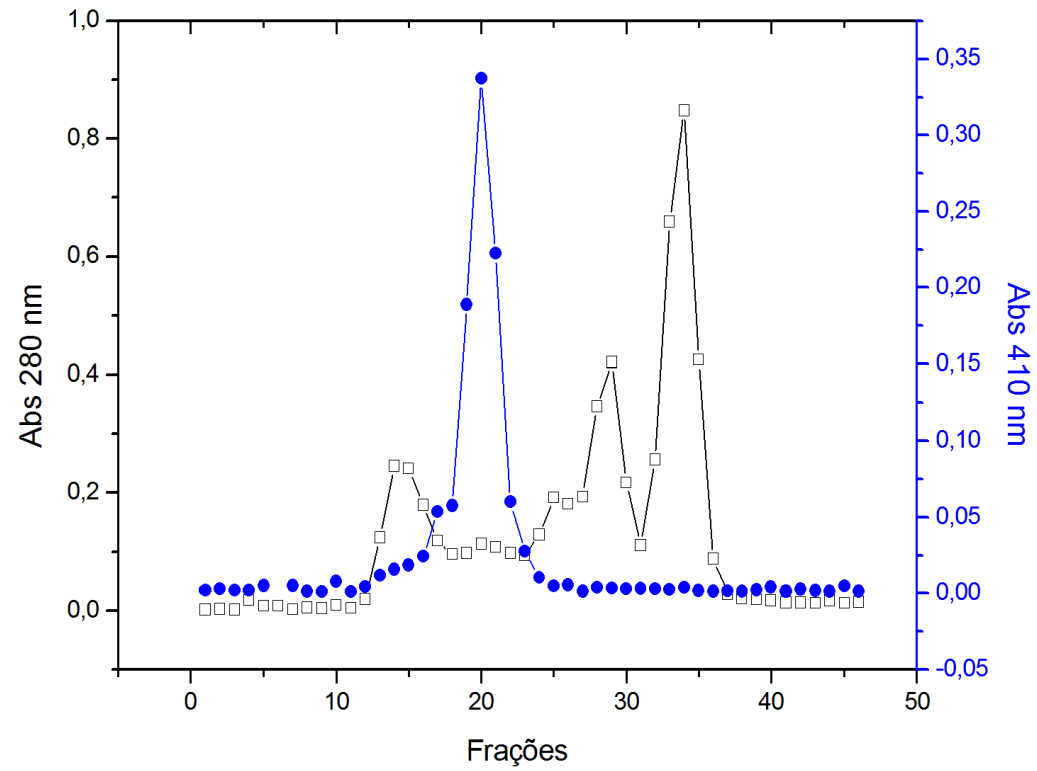
Na tabela 4 é possível verificar uma boa resolução da precipitação salina do extrato do dourado do mar, pois a atividade da enzima concentrou-se na fração 40-60%. Tripsinas de outros peixes geralmente ficam concentradas nessa fração a tripsina do *Lophiosilurus alexandri* (Pacamã) também ficou com atividade concentrada na fração 40-60% (SANTOS et al., 2016). A tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus* L) teve a atividade da tripsina concentrada na fração 20-60% (UNAJAK et al., 2012). A recuperação também foi considerada boa, cerca 52% da enzima foi recuperada, comparada a outras tripsinas de peixes, como a da tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) que recuperou 39% e a tripsina do *Diapterus rhombeus* foi de 36,2% na fração 30-60% de sulfato de amônio (SILVA et al., 2011).

5.3 Cromatografia de filtração em gel

A fração 40-60% do fracionamento salino foi a que apresentou maior atividade específica para a tripsina e foi aplicada em coluna de gel-filtração S100 HR, equilibrada com tampão Tris-HCl 50 mM pH 8,0 + 0,5 M de NaCl no fluxo de 0,1 mL por minuto, foram coletados frações de 2 mL. Na figura 12 é possível observar o cromatograma gerado a partir desta cromatografia no software Origin 6.0 Professional.

A escolha da coluna de gel-filtração para a purificação da tripsina do dourado do mar foi realizada a partir do perfil eletroforético na fração 40-60% do fracionamento, a mesma apresentou um perfil de bandas mais separadas o que permitia o uso da filtração em gel. Essa análise previa no perfil de bandas permite uma maior eficiência na purificação de proteínas.

Figura 12: Cromatografia de filtração em gel S-100 HR com fração 40-60% do fracionamento salino. Linha preta leitura A 280 nm e linha azul leitura 410 nm.



Fonte: Elaborado pela autora

No cromatograma acima a linha preta refere-se aos picos das proteínas visualizadas em comprimento de onda de 280 nm das frações e a linha em azul, são provenientes das reações de hidrólise realizadas para identificar a atividade da tripsina nas frações coletadas da cromatografia. A presença de um único pico com atividade hidrolítica para tripsina é evidente nas frações (F19, F20, F21). No cromatograma também é possível verificar uma boa resolução, visto que os picos foram separados. Houve ainda uma boa recuperação da tripsina do dourado do mar, com 60% nas três frações acima citadas. Uma característica que se destaca para a tripsina do dourado do mar é a alta atividade hidrolítica com baixa concentração de proteínas.

A purificação de tripsinas de peixes é feita utilizando diversos tipos de colunas cromatográficas, que vão desde filtração em gel, como a tripsina purificada do *Diapterus rhombeus* que foi isolada com uma Sephadex G-75 (SILVA et al., 2011), como colunas de troca iônica, como por exemplo a tripsina do *Lophiosilurus alexandri* (Pacamã) purificada com uma DEAE-Sepharose (SANTOS et al., 2016). Como também podem ser utilizadas 2 ou mais tipos de colunas diferentes para obter a tripsina purificada, como por exemplo, a tripsina do *Barbus callensis* isolada com uma Sephadex G-100 e uma Mono Q-Sepharose (SILA et al., 2012).

A purificação de enzimas com apenas um passo cromatográfico não é facilmente obtida, mas é proveniente de variáveis que devem ser observadas, como descreve a SIGMA-ALDRICH, 2016: volume da coluna, fluxo adequado para eluição, escolha do melhor tampão a ser utilizado para a enzima em questão e quantidade da amostra aplicada na coluna.

A utilização de apenas um passo cromatográfico para a purificação garante também uma boa taxa de recuperação, visto que 2 ou mais passos cromatográficos (filtração em gel, troca iônica e afinidade) reduzem as taxas de recuperação, como visto na purificação de *Arapaima gigas* com 17% de recuperação, *Channa argus* com 12,6%, e do *Rachycentron canadum* com recuperação de 8,6% (JUNIOR et al., 2012, ZHOU et al., 2012, FRANÇA et al., 2016)

Na tabela 5 é possível verificar o resumo da purificação da tripsina do *Coryphaena hippurus* (dourado do mar)

Tabela 5: Resumo da purificação da tripsina isolada do <i>Coryphaena hippurus</i> (dourado do mar)			
Etapas de purificação:	Ativ. Total (U/mL)	Total de proteínas (mg/mL)	Ativ. Específica – Recuperação%
Extrato Bruto	0,223	0,322	173, 136 100
Fração 40-60%	0,769	0,372	517,33 52%
Gel Filtração (F19, F20 e F21)	1,804	0,069	6,241.81 60%

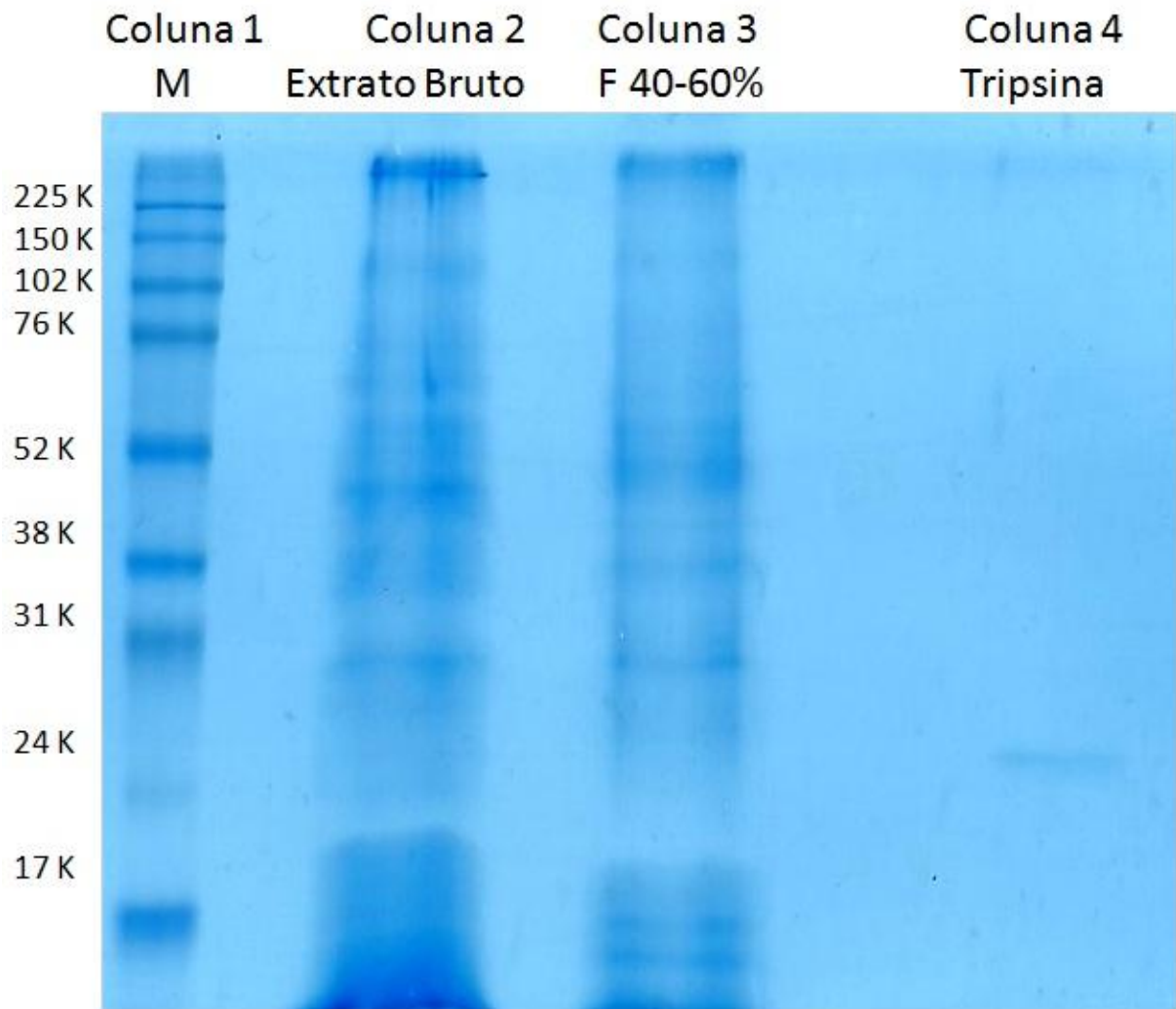
Fonte: Elaborada pela autora.

5.4 Eletroforese SDS-PAGE

O SDS-PAGE foi utilizado para acompanhar a purificação da tripsina e analisar o perfil de bandas proteicas em cada etapa de purificação, o gel com 15% de poliacrilamida foi o que apresentou melhor o tamanho aproximado da enzima pura, tamanho em torno de 26 kDa. Essa massa molecular aproximada é compatível com outras tripsinas de peixes. As tripsinas do *Lophiosilurus alexandri* (Pacamã) com 24 kDa (SANTOS et al., 2016), do *Cirrhinus mrigala* com 21,7 kDa (KHANGEMBAM et al., 2015), do *Oncorhynchus masou* com 24 kDa (KANNO et al., 2010).

Na figura 13 é possível verificar as etapas da purificação da tripsina do *Coryphaena hippurus*, na coluna 1 esta o padrão de massa molecular, coluna 2 extrato bruto mostrando a complexidade da amostra, com muitas bandas de proteínas, na coluna 3 a fração 40-60% do fracionamento salino, já é possível verificar uma redução na quantidade de bandas, confirmando a retirada de muitos contaminantes no fracionamento salino e na coluna 4 a enzima purificada após uma cromatografia da filtração em gel e a presença de uma proteína com apenas uma subunidade, pois foi utilizado agente redutor e fervura na realização desta eletroforese. A cromatografia de filtração em gel mostrou-se muito eficiente na purificação da tripsina do *Coryphaena hippurus*.

Figura 13: Gel SDS-PAGE 15%, etapas da purificação da tripsina do *Coryphaena hippurus* (dourado do mar) coluna 1 padrão de massa molecular, coluna 2 extrato bruto, coluna 3 fração 40-60% e coluna 4 tripsina purificada. Gel corado com comassiae brilhante.



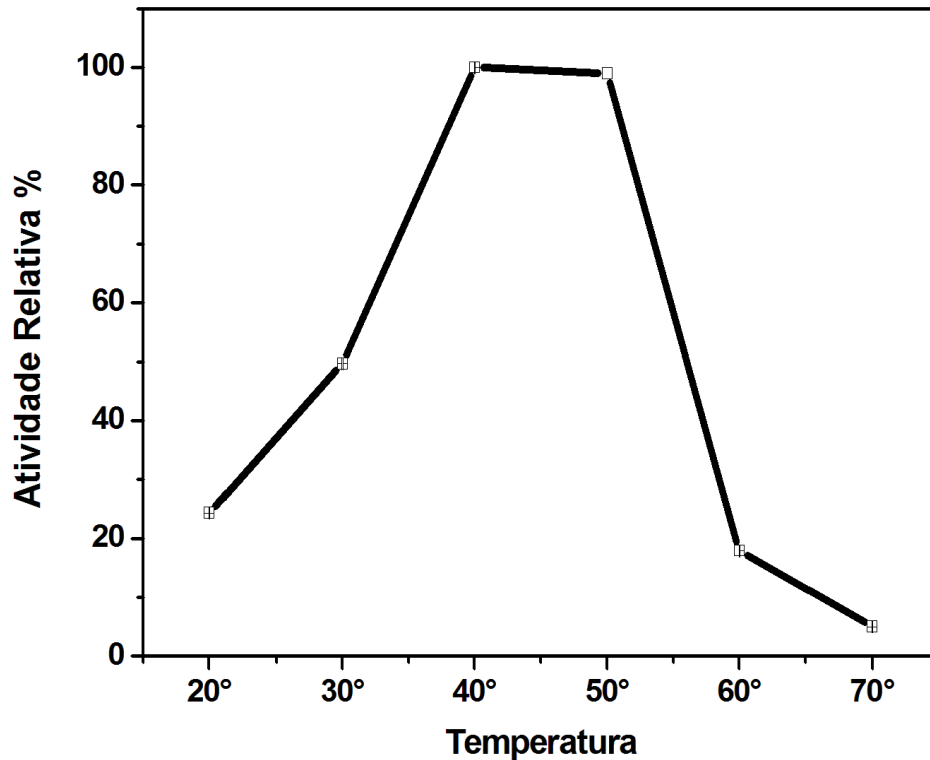
Fonte: Elaborado pela autora.

5.5 Teste de temperatura ótima e estabilidade térmica

As enzimas apresentam algumas características específicas para realizar sua atividade catalítica, elas dependem de temperaturas e pH específicos para atingir o máximo de sua atividade (FRANÇA, 2013).

Encontrar a temperatura ótima da enzima é um passo essencial para possíveis aplicações dessa enzima. Na figura 14 é possível verificar o comportamento da tripsina do *Coryphaena hippurus* em variadas temperaturas, as reações foram realizadas em pH ótima desta enzima. A temperatura de 40°C foi onde a enzima apresentou 100% de sua atividade, mas a temperatura de 50°C reteve 98,99% da atividade, mostrando que a 40° ou 50° a enzima atinge o máximo de sua atividade, análises feitas em triplicada.

Figura 14: Análise de temperatura ótima para a tripsina do *Coryphaena hippurus* (dourado do mar) n=3.



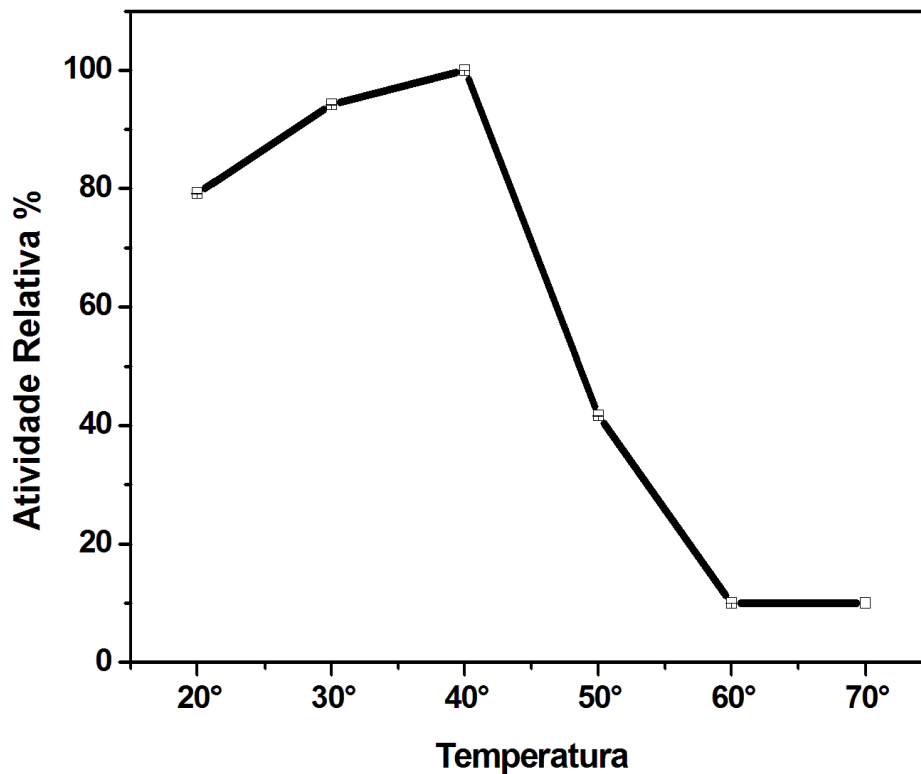
Fonte: Elaborado pela autora.

Enzimas com atividades em temperaturas elevadas permite visualizar aplicações industriais que requerem altas temperaturas (JELLOULI et al., 2009). Além da atividade máxima em temperaturas elevadas, a estabilidade por determinados tempos em temperaturas elevadas são importantes para a utilização em processos biotecnológicos.

Dessa forma a estabilidade térmica é uma característica importante para determinadas enzimas, a tripsina é uma protease que se destacam pela estabilidade térmica, principalmente as tripsinas de organismos marinhos (EISENTHAL et al., 2006). A tripsina do dourado do mar apresentou estabilidade térmica máxima a 50°C com retenção de 50% da atividade, acima dessa temperatura a tripsina perdeu sua atividade (Figura 15).

Em comparação com outras tripsinas de peixes, a estabilidade térmica da tripsina do dourado do mar foi considerada alta. A tripsina isolada da sardinelle (*Sardinella aurita*) teve sua atividade reduzida em 80% quanto incubada por 1 hora a 50°C (KHALED et al., 2011). A tripsina do *Diapterus rhombeus* teve 100% de sua atividade reduzida a 55°C (SILVA et al., 2011).

Figura 15: Análise da estabilidade térmica da tripsina isolada do *Coryphaena hippurus* (dourado do mar) n=3.



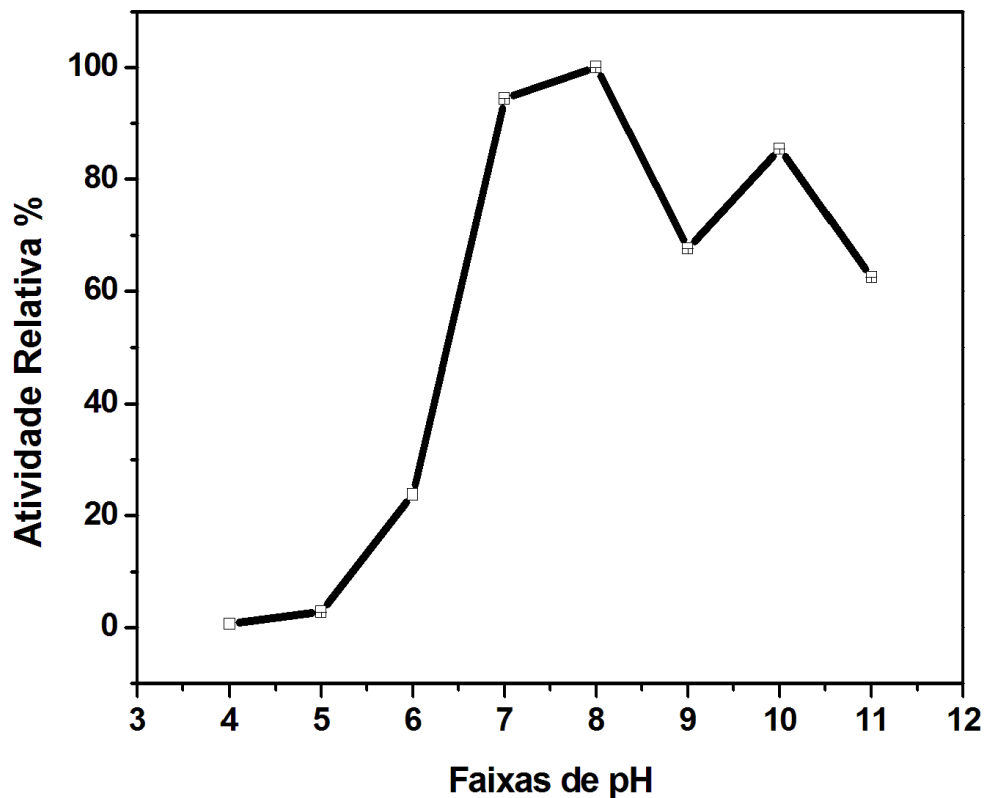
Fonte: Elaborado pela autora.

5.6 Teste de pH ótimo e estabilidade em pH

As tripsinas são proteases alcalinas, ou seja, exercem sua atividade em pH alcalino, essa característica das tripsinas permitiu ampliar sua utilização em processos industriais que acontecem em extremos de pH (HADDAR et al., 2009).

A tripsina do dourado do mar apresentou máxima atividade em pH 8,0, utilizando a solução tampão de Tris-HCl 100 mM por 1 hora a 40°C, como mostra a figura 16.

Figura 16: Análise de pH ótimo para tripsina do *Coryphaena hippurus* (dourado do mar).



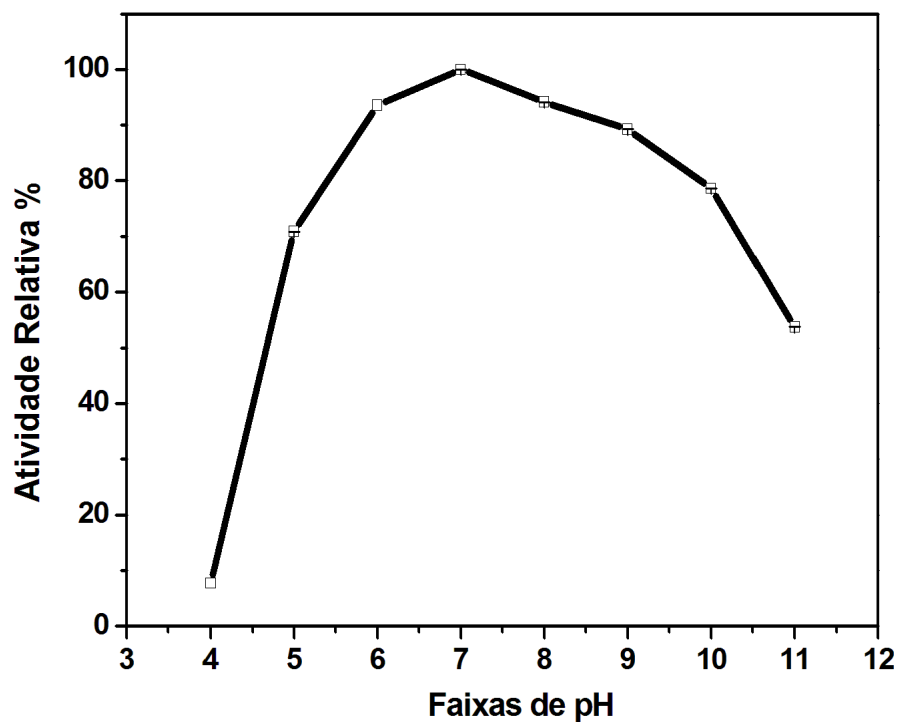
Fonte: Elaborado pela autora

A atividade enzimática em determinados pH está relacionada com a estrutura primária da proteína, a sequência de aminoácidos. Alguns aminoácidos têm grupos ionizáveis, ou seja, podem ser protonados ou desprotonados dependendo do pH do meio. Essa característica permite alterar de forma significativa as interações que os resíduos de aminoácidos fazem entre si e dessa forma gera a mudança na estrutura tridimensional da proteína. Sabendo que a estrutura tridimensional está relacionada com a atividade da enzima, quando ela perde ou modifica sua estrutura

tridimensional, perde sua atividade catalítica. Evidenciando porque algumas enzimas perdem sua atividade quando exposta a diferentes pH.

A estabilidade em pH variados da tripsina do dourado do mar é alta, pois conseguiu ser estável entre o pH 5,0 e o 10,0 com mais de 70% da atividade, como mostra a figura 17. Essa característica é muito comum entre as tripsinas de organismos marinhos, a tripsina isolado do Pacamã apresentou estabilidade entre os pH 6,0 e o 11,0 com mais de 70% da atividade (SANTOS et al., 2016), a tripsina do *S. officinalis* é estável entre os pH 6,0 e 11,0 com 70% da atividade (BALTI et al., 2009). Na figura 17 é possível verificar a estabilidade da enzima em diferentes pH.

Figura 17: Análise da estabilidade da tripsina do *Coryphaena hippurus* (dourado do mar) em diferentes pH.



Fonte: Elaborado pela autora.

Essa estabilidade em uma ampla faixa de pH permite a utilização da tripsina em vários processos industriais, a indústria de detergentes utiliza muito as proteases com alta estabilidade em pH, essas enzimas auxiliam na remoção de manchas de

queratina, sangue, leite e molhos, entre outros e suportam a presença de surfactantes que alcalinizam ainda mais o meio (SAEKI et al., 2007).

Os detergentes devido a grande quantidade de surfactantes são muito alcalinos e utilizar enzimas que não suportem pH básico, iria reduzir muito ou eliminar a atividade hidrolítica da enzima, dificultando a remoção de manchas durante a lavagem. As proteases que apresentam atividade em uma ampla faixa de pH são essenciais para aumentar a remoção de manchas de detergentes contendo enzimas ativas, além de serem biodegradações e por não utilizarem catalisadores químicos diminuem os índices de alergias entre os usuários (Dorra et al., 2018).

Contudo não é apenas a indústria de detergentes que utilizam proteases, as industriais farmacêuticas, a de alimentos, a pesquisa de base também buscam novas proteases que apresentem características importantes para seus processos, é por isso que as proteases atualmente representam mais de 60% do mercado de enzimas no mundo e são amplamente estudadas (LI et al., 2013).

5.7 Teste de inibição

Algumas enzimas tem sua atividade reduzida ou eliminada na presença de inibidores, esses inibidores podem ser específicos para tripsina ou por classes. A utilização de inibidores em tripsinas purificadas auxilia na classificação dessas enzimas, a tabela 6 mostra os efeitos dos inibidores sobre a atividade da tripsina do *Coryphaena hippurus* (dourado do mar).

Tabela 6: Inibidores utilizados frente a tripsina do *Coryphaena hippurus* (dourado do mar).

Inibidores	Concentrações	Atividade Residual (%)
EDTA (Ethylenediamine tetraacetic acid)	1 mM	60
PMSF (Phenylmethane sulfonyl flouride)	1 mM	4,86
PMSF (Phenylmethane sulfonyl flouride)	5 mM	0
2-Mercaptoetanol	5 mM	45,41%
Benzamidina	1 mM	3,29%
Benzamidina	5 mM	0%
SBTI (Soybean Trypsin Inhibitors)	1 mg/mL	0

Fonte: Elaborada pela autora.

A atividade da tripsina foi totalmente inibida por PMSF, Benzamidina e SBTI, que são específicos para serino proteases e tripsina respectivamente. O EDTA não inibiu totalmente a atividade da enzima, visto que este é um inibidor de metaloprotease, atua como quelante dos íons de Ca^{2+} essenciais para atividade da enzima (BALTI et al., 2009). O 2-Mercaptoetanol é um inibidor de tiol proteases, também chamada de cisteíno protease, este interfere nos resíduos de cisteína relacionados ao sítio ativo da enzima, dessa forma o 2-Mercaptoetanol não conseguiu inibir totalmente a atividade da tripsina do dourado do mar, devido a ausência do resíduo de cisteína no sítio ativo. A inibição parcial pode ser resultado da interação do 2-mercaptoetanol com outros resíduos de serina da proteína, alterando sua estabilidade conformacional. O PMSF é um inibidor competitivo irreversível, liga-se os resíduos de serina nos sítios ativos de serino proteases, interferindo totalmente na atividade da enzima.

Benzamidina e o SBTI (*Soybean trypsin inhibitors*) são inibidores competitivos reversíveis da tripsina, ou seja, compete pelo sítio ativo da enzima com o substrato, porém em altas concentrações de substrato o mesmo consegue remover o inibidor e se ligar ao sítio catalítico da enzima estabelecendo a atividade. Diante deste perfil de inibição é possível classificar a tripsina isolada do dourado do mar como serino protease do tipo tripsina.

5.8 Efeito dos íons metálicos

Algumas enzimas apresentam cofator, ou seja, para exercer sua atividade catalítica ela deve estar ligada a um íon metálico. Para verificar se a tripsina isolada do dourado do mar tem sua atividade alterada na presença de alguns íons metálicos, estes foram inseridos a reação e incubados na temperatura e pH ótimo da enzima por 1 hora.

Na tabela 7 é possível verificar que alguns íons metálicos exerceram efeitos negativos na atividade da enzima, o zinco, cobre e manganês reduziram mais 80% a atividade da enzima, contudo o cálcio melhorou a atividade da enzima. É conhecido que o cálcio interage com algumas proteínas, aumentando a estabilidade da mesma, a interação do cálcio com proteases já conhecida, contudo o mecanismo de estabilização ainda não é conhecido (KOTORMAN et al., 2003).

Tabela 7: Análise dos efeitos dos íons metálicos na atividade da tripsina do *Coryphaena hippurus* (dourado do mar).

Íons Metálicos	Concentrações (mM)	Atividade Residual (%)
Zn ²⁺	5	18,26
Cu ²⁺	5	18,86
Fe ²⁺	5	41,01
Mg ²⁺	5	55,83
Ca ²⁺	5	101,79
Mn ²⁺	5	12,87
Controle positivo	-	100%

Fonte: elaborada pela autora.

Outras tripsinas de peixes também tem sua atividade reduzida na presença de alguns metais, a tripsina do *Pterygoplichthys disjunctivus* que teve sua atividade reduzida em 91%, 85% e 71% por Mg²⁺, Mn²⁺ e Cu²⁺ respectivamente (VILLALBA-VILLALBA et al., 2013) e a tripsina do *Salaria basilisca* que perdeu 100% da atividade da tripsina na presença de Zn²⁺ e Cu²⁺ e Mg²⁺ reduziu 86% da atividade (KTARI et al., 2012).

O mecanismo de diminuição da atividade da tripsina na presença dos íons metálicos é pouco esclarecido, contudo sugeri-se que os metais influenciem no sítio de ligação da enzima com o substrato (SILA et al., 2012).

5.9 Zimografia

Na zimografia é possível verificar a hidrólise do substrato (caseína) incorporado ao gel de poliacrilamida, na figura 18 a zona branca no gel azul é onde ocorreu a hidrólise do substrato pela tripsina do *Coryphaena hippurus* (dourado do mar). Com isso é possível verificar a capacidade da tripsina do dourado do mar em ser incorporada em matriz sólida com a manutenção de sua atividade, característica muito importante para vários processos industriais. O descolamento menor da banda no gel é devido a copolimerização do gel com caseína o que o torna menos permeável (diminui os poros do gel) e conseqüentemente menor o deslocamento da tripsina isolada (coluna 4 X 5).

A zimografia também foi utilizada para verificar a atividade relativa da tripsina do *Coryphaena hippurus* (dourado do mar) quando submetido à ação de detergentes

comerciais. A verificação da atividade da tripsina com o substrato BAPNA não é possível devido à precipitação do mesmo na presença dos detergentes.

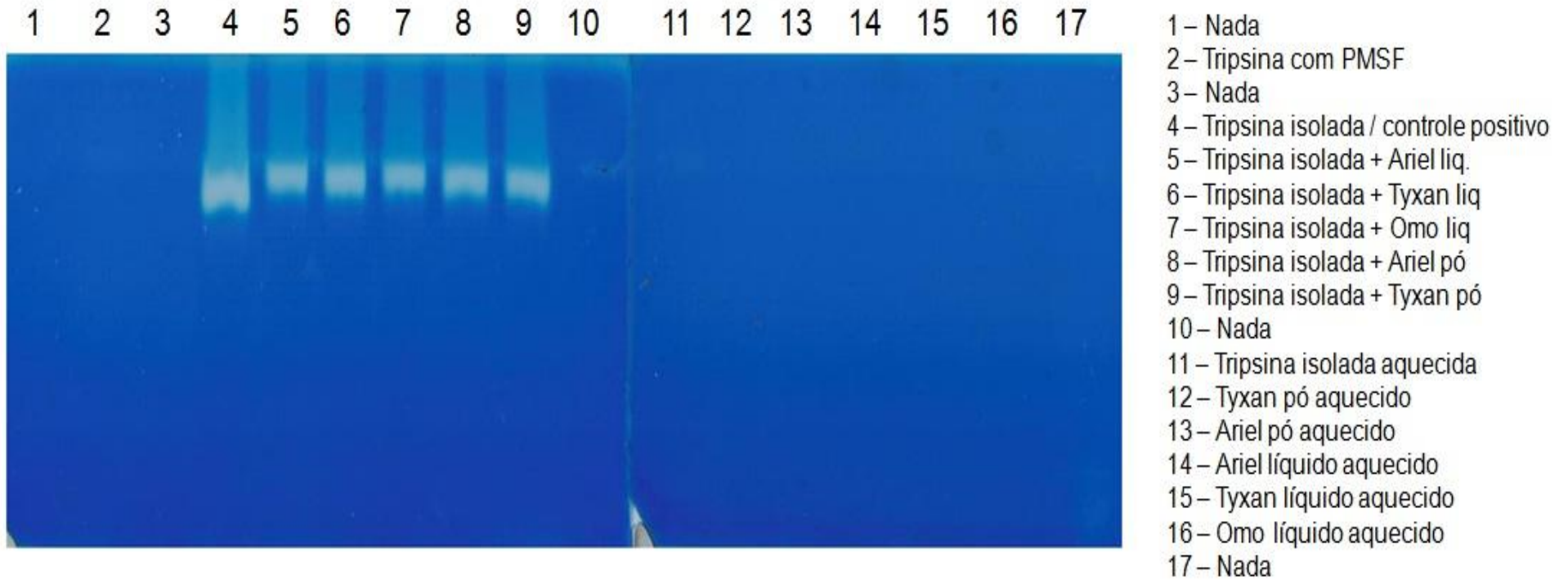
5.10 Compatibilidade e Estabilidade em detergentes comerciais

Atualmente os detergentes comerciais estão utilizando enzimas como catalisadores biológicos para aumentar a eficácia na remoção das manchas de tecidos. Essas enzimas precisam ter algumas características que as tornem aplicáveis na utilização em detergentes. Entre as principais características estão: ter boa estabilidade em térmica e em pH variados, suportando pH alcalinos, visto os detergentes tem agentes surfactantes fortes que alcalinizam muito o meio.

A tripsina está enzimas utilizadas como aditivos de detergentes, devido a sua alta capacidade hidrolítica e sua boa estabilidade em meios alcalinos e temperatura. A tripsina isolada do *Coryphaena hippurus* (dourado do mar) demonstrou compatibilidade e estabilidade com todos os detergentes comerciais testados, a mesma conseguiu manter-se viável e continuar com alta atividade catalítica na presença de detergentes, mostram sua capacidade em ser utilizada como aditivos em detergentes, bem como em outros processos industriais que envolvam altas estabilidade térmica e ampla variação de pH.

Na figura 18 é possível visualizar sua atividade catalítica alta na presença dos detergentes comerciais. A tripsina tratada com PMSF foi utilizada como controle negativo e a tripsina sem tratamento como controle positivo, entre as colunas 5-9 são possíveis verificar as hidrólises da tripsina na presença dos detergentes. Entre as colunas 11-16 estão os detergentes após aquecimento por 1 hora a 70°C, mostrando que suas enzimas endógenas foram destruídas e toda hidrólise que ocorre nas colunas 5-9 é proveniente da atividade da tripsina isolada.

Figura 18: Análise da compatibilidade e estabilidade da tripsina purificada em detergentes comerciais



Fonte: Elaborado pela autora

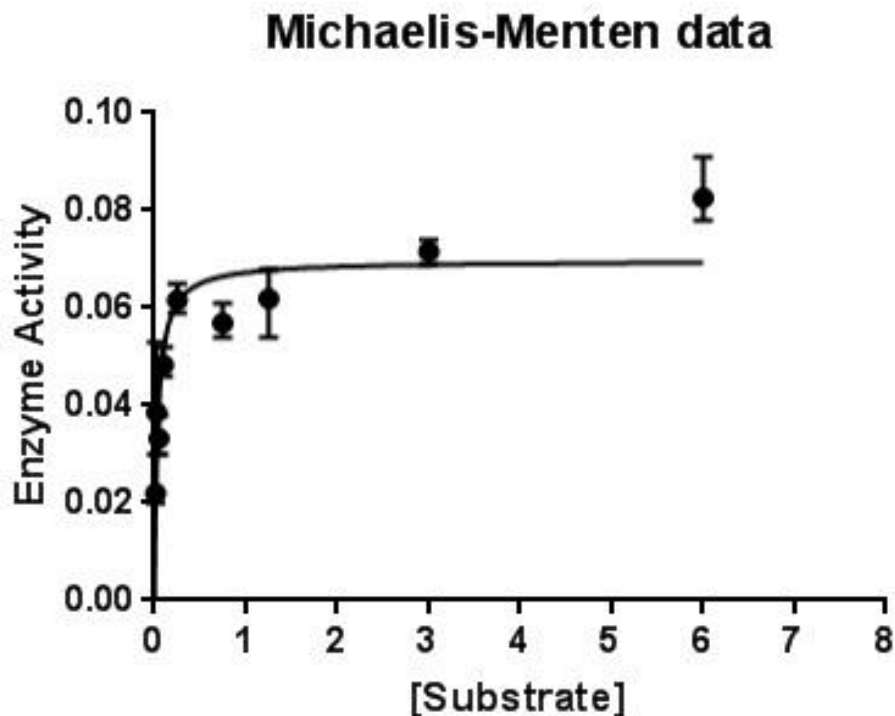
5.11 Determinação de Proteínas

A concentração proteica da tripsina do *Coryphaena hippurus* (dourado do mar) é de 0,0694 mg/mL de acordo com o método de Bradford, concentração proteica baixa, porém com atividade específica alta de 6,241.81.

5.12 Cinética Enzimática

A atividade da tripsina purificada foi avaliada em diferentes concentrações do substrato BAPNA (0,015 – 6 mM). A constante de Michaelis-Menten (K_m) e a constante de catálise (K_{cat}) foram 0,035 mM e 241,037 S^{-1} . Na tabela 8 é possível verificar a comparação entre as constantes cinéticas de outras tripsinas de peixes, destacando os K_m da tripsina do *Coryphaena hippurus* e do *Barbus callensis*, este apresentaram os menores K_m .

Figura 19: Curva de Michaelis – Menten para tripsina variando a concentração do substrato BAPNA (0,0015 – 6,0 mM).



Fonte: Elaborado pela autora.

Tabela 8: Quadro comparativo entre K_m e K_{cat} de tripsinas isoladas de peixes.

Espécie	K_m (mM)	$K_{cat} S^{-1}$	Autores e ano
<i>Coryphaena hippurus</i>	0,035	241,037	Este estudo
<i>P. disjunctivus</i>	0,13	1,46	Villalba et al., 2013
<i>Sardinella aurita</i>	0,083	1,21	Khaled et al., 2011
<i>S. sagax caerulea</i>	0,051	4	Asgeirson et al., 1989
<i>E. japônica</i>	0,049	1.55	Heu et al., 1995
<i>Sepia officinalis</i>	0,064	2.32	Balti et al., 2009
<i>Oreochromis nitoticus L.</i>	0,16	23.85	Unajak et al., 2012
<i>Balistes capriscus</i>	0,068	40.6	Jellouli et al., 2009
<i>Cirruhinus mrigala</i>	0,0672	92.09	Kumar et al., 2015
<i>Barbus callensis</i>	0,018	1.21	Sila et al., 2012
<i>Penaeus vannamei</i>	16,8	-	Dadshahi et al., 2016

Fonte: Tabela comparativa elaborada pela autora.

6 CONCLUSÕES

- Foi realizada a preparação do extrato bruto a partir do intestino do *Coryphaena hippurus* (dourado do mar), onde se encontrava a maior concentração de tripsina entre os órgãos digestivos analisados;
- O fracionamento salino foi eficiente na remoção de grande parte de contaminantes e na concentração da tripsina em uma única fração 40-60%;
- A tripsina foi purificada utilizando uma única coluna cromatográfica de filtração em gel S-100 HR acoplada ao *AKTA pure*, com taxa de recuperação de 60%;
- A temperatura ótima da enzima isolada foi entre 40°C e 50°C, a mesma manteve-se estável até 50°C com 50% da atividade enzimática;
- O pH ótimo da enzima foi de 8,0 semelhante ao pH de atividade das enzimas alcalinas e a estabilidade em pH variados foi considerada ampla, a mesma foi estável entre o pH 5,0 a 10,0 com 70% da atividade;
- A enzima foi classificada como tripsina do tipo serino protease, foram utilizados 5 diferentes inibidores enzimáticos: PMSF, EDTA, Benzamidina, SBTI e 2-Mercaptoetanol, a enzima foi totalmente inibida por PMSF 5 mM, Benzamidina 5 mM e SBTI 5 mM sugerindo sua classificação;
- Alguns íons metálicos influenciaram negativamente a atividade catalítica da enzima, o Cu^{2+} , Fe^{2+} , Mg^{2+} , Mn^{2+} , Zn^{2+} , contudo o Ca^{2+} estabilizou e aumentou a atividade da enzima;
- A enzima apresentou alta compatibilidade e estabilidade na presença de detergentes comerciais, mostrando seu excelente potencial para a utilização como aditivos em detergentes, destacando seu potencial em manter sua atividade em matriz sólida.
- A concentração proteica foi considerada baixa com 0,06694 mg/mL, porém com alta atividade específica 6,241.81;
- As constantes cinéticas analisadas foram consideradas ótimas, o K_m foi de 0,035 mM e a K_{cat} foi de 241,035 S^{-1} .

REFERÊNCIAS

- ALMAZÁN, A. M. PAZ, A. S. Invertebrate trypsins: a review. **J Comp Physiol B** (2008) 178:655-672.
- ALMONT, G. A; SWEAT, J. D. **Serine proteases, serine proteases inhibitors, and protease-activated receptors: Roles in synaptic function and behavior.** Brain research 1407 (2011) 107-122.
- ARRUDA, L. F. **Aproveitamento do resíduo do beneficiamento da Tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) para obtenção de silagem e óleo como subprodutos.** Dissertação (Ciências e Tecnologia de Alimentos) Universidade Federal de São Paulo, Piracicaba, SP, 2004.
- BALTI, R. BARKIA, A; BOUGATEF, A; KTARI, NASRI, M. A health-stable trypsin from the hepatopancreas of the cuttlefish (*Sepia officinalis*): Purification and Characterisation. **Food Chemistry** 113 (2009) 146-154.
- BARRETO, M. C. SECA, A. COSTA, A. NETO, A. SIMÕES, N. Potencial Biotecnológico do mar dos Açores. **Biociência Marinha**, série 2. Número 5. Junho de 2014.
- BEZERRA, R. S.; VIEIRA, V. L. A.; CARVALHO JR, L. B.; Proteases no trato digestivo de Peixes. **Biociência Ciência e Desenvolvimento** – nº 22 – setembro/outubro 2001.
- BOUGATEF, A. Trypsins from fish processing waste: characteristics and biotechnological applications – comprehensive review. **Journal of Cleaner Production** 57 (2013) 257-265.
- 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.
- CAL, J. A. **Histologia do Trato Digestório de Surubim-pintado (*Pseudoplatystoma coruscans* – Agassiz – 1829).** Dissertação (Anatomia dos Animais domésticos e silvestres) Universidade Federal de São Paulo, São Paulo, SP.

CHACON, D. M. M. & LUCHIARI, A. C. **Fisiologia e Comportamento de Peixes.**

Texto publicado no site do grupo de estudos e ecologia e fisiologia de animais aquáticos (www.geafaa.com), 2011.

CARVALHO, L. C. T. **Produção de lipases e biossurfactantes por bactérias**

isoladas de um solo contaminado com óleo vegetal residual. Dissertação (Biologia Celular e Molecular) Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, PB, 2012.

DADSHAHI, Z. HOMAEI, A. ZEINALI, F. SAJEKI, R. H. KHAJEH, K. Extraction and purification of a highly thermostable alkaline caseinolytic protease from wastes *Penaeus vannamei* suitable for food and detergent industries. **Food Chemistry** 202 (2016) 110-115.

DAVID L. NELSON; MICHAEL M. COX. **Princípios de Bioquímica de Lehninger.** 6° Ed. Porto Alegre: Artemed, 2014. 1298p.

DENG, A; WU, J; ZHANG, Y; ZHANG, G; WEN, T. Purification and characterization of a surfactant-stable high-alkaline protease from *Bacillus* sp. B001. **Bioresouce Technology** 101 (2010) 7100-7106

DOCKRAY, G. J.; Gastrin. **Best Practice & Research Clinical Endocrinology & Metabolism** Vol. 18, No. 4, pp. 555-568, 2004.

DORRA, G. INES, K; IMEN, S. B.; LAURENT, C.; SANA, A.; TABBENE, O.; PASCAL, C. THIERRY, J.; FERID, L. Purification and characterization of a novel high molecular weight alkaline protease produced by endophytic *Bacillus* halotolerants stain CT2. **International Journal of Biological Macromolecules.** S0141-8130(17)34167-3

ELGENGY, A. ABDELRASSOL, K. A literature review on trypsin enzyme. **Food Chemistry** 110 (2016) 109-115.

EISENTHAL, R; PETERSON, M. E; DANIEL, R. M; DANSON, M. J. The thermal behavior of enzyme activity: implications for biotechnology. **Trends in Biotechnology** vol.24 No.7 July 2006

ESTEVEES, A. I. S. COSTA, R. Esponjas marinhas: do mar à farmácia. **Biociencia Marinha**, série 2. Número 5. Junho de 2014.

ESPÓSITO, T. S.; AMARAL, I. P.G.; BUARQUE, D. S.; OLIVEIRA, G.B.; CARVALHO JR, L. B.; BEZERRA, R. S. Fish processing waste as a source of alkaline proteases for laundry detergent. **Food Chemistry** 112 (2009) 125-130.

FAO – **Organização das Nações Unidas para a Agricultura e Alimentação**. The State of World Fisheries and Aquaculture, 2016

FARRELL, E. R.; BOUSTANY, A. M.; HALPIN, P. N.; HAMMOND, D.L.; Dolphinfish (*Coryphaena hippurus*) distribution in relation to biophysical ocean conditions in the northwest Atlantic. **Fisheries Research** 151 (2014) 177-190.

FEDATTO, L. M. **Caracterização de Proteases extracelulares produzidas por *Xylella fastidiosa* de citros e videira**. Dissertação (Ecologia de Agroecossistemas). Universidade de São Paulo, Piracicaba, SP, 2004.

FRANÇA, R. C. P; ASSIS, C. R. D.; SANTOS, J. F.; TORQUATO, R. J. S.; TANAKA, A. S.; HIRATA, I. Y.; ASSIS, D. M.; JULIANO, M. A.; CAVALLI, R. O.; CARVALHO JR, L. B.; BEZERRA, R. S. Bovine pancreatic trypsin inhibitor immobilized onto sepharose as a new strategy to purify a thermostable alkaline peptidase from cobia (*Rachycentron canadum*) processing waste. **Journal of Chromatography B**, 1033-1034 (2016) 210-217.

FRANÇA, P. C. R. **Caracterização bioquímica e molecular da tripsina dos cecos pilóricos do Bijupirá (*Rachycentron canadum*) e sua compatibilidade com formulações de detergentes**. Tese (Doutorado em ciências biológicas) Universidade Federal de Pernambuco, Recife Pernambuco, 2013.

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

GRUPTA, R.; BEG, Q. K.; LORENZ, P. Bacterial alkaline proteases: molecular approaches and industrial applications. **Appl Microbiol Biotechnol** (2002) 59: 15-31.

GUILLÉN, C. N.; RONNESTAD, I; JORDAL, A. E. O.; MOYANO, F. J; YÚFERA, M. Involvement of cholecystokinin (CCK) in the daily pattern of gastrointestinal regulation of Senegalese sole (*Solea senegalensis*) larvae reared under different

feeding regimes. **Comparative Biochemistry and Physiology**, Part A 203 (2017) 126-132.

HADDAR, A; BOUGATEF, A; AGREBI, R; SELLAMI-KAMOUN, A; NASRI, M. A novel surfactant-stable alkaline serine-protease from a newly isolated *Bacillus mojavensis* A21. Purification and Characterization. **Process Biochemistry** 44 (2009) 29-35.

HEDSTROM, L. Serine Protease Mechanism and Specificity. **Chem. Rev.** 2002, 102, 4501-4523.

HJELMELAND AND RAA, J. Characteristics of two trypsin type isozymes isolated from the arctic fish capelin (*Mallotus villosus*). **Comp. Biochem. Physiol.** Vol. 71B. No. 4. Pp. 557 to 562, 1982.

HOMAEI, A. LAVAJOO, F. SARIRI, R.; Development of marine biotechnology as a resource for novel proteases and their role in modern biotechnology. **International Journal of Biological Macromolecules** 88 (2016) 542-552.

JELLOULI, K; BOUGATEF, A; DAASSI, D; BALTI, R; BARKIA, A; NASRI, M. New alkaline trypsin from the intestine of Grey triggerfish (*Balistes capriscus*) with high activity at low temperature: Purification and characterization. **Food Chemistry** 116 (2009) 644-650.

KANNO, G; YAMAGUCHI, T; KISHIMURA, H; YAMAHA, E; SAEKI, H. Purification and characteristics of trypsin from masu salmon (*Oncorhynchus masou*) cultured in fresh-water. **Fish Physiol Biochem** (2010) 36:637-645.

KHALED, H. B. JELLOULI, K. SOUISSI, N. GHORDEL, S. BARKIA, A. NASRI, M. Purification and characterization of three trypsin isoforms from viscera of sardinelle (*Sardinella aurita*). **Fish Physiol Biochem** (2011) 37: 123-133.

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

KOTORMÁN, M. LACZKÓ, I. SZABÓ, A. SIMON, L. M. Effects of Ca²⁺ on catalytic activity and conformation of trypsin and α -chymotrypsin in aqueous ethanol. **Biochemical and Biophysical Research Communications** 304 (2003) 18-21.

KIM M.; JEONG Y. Purification and characterization of a trypsin-like protease from flatfish (*Paralichthys Olivaceus*) intestine. **Journal of Food Biochemistry**, n. 37, p. 732-741, 2012, ISSN: 1745-4514.

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

KTARI, N.; KHALED, H. B.; NASRI, R.; JELLOULI, K.; GHORDEL, S.; NASRI, M. Trypsin from zebra blenny (*Salaria basilisca*) viscera: Purification, characterization and potential application as a detergent additive. **Food Chemistry** 130 (2012) 467-474.

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

LI, Q; YI, L; MAREK, P.; IVERSON, L. B. Commercial proteases: present and future. **FEBS Letters** 587 (2013) 1155-1163.

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

MARQUES, L. C.; ALVES, D. R.; Ecologia da comunidade de metazoários parasitos do dourado, *Coryphaena hippurus* Linnaeus, 1758, (Osteichthyes: Coryphaenidae) do litoral do Estado do Rio de Janeiro, Brasil. **Cadernos UniFOA**, Edição nº16 – Agosto/2011.

MENDES, Chirleanny Maciel. **Avaliação da estabilidade de proteases de intestino de tilápia do Nilo como aditivo para indústria de detergentes.**

Dissertação (Mestre em Bioquímica) Universidade Federal de Pernambuco, Recife, PE, 2007.

MONTEIRO, N. V.; SILVA, R. N. Aplicações Industriais da Biotecnologia Enzimática. **Revista científica da Faculdade de Tecnologia SENAI**, Goiânia, v.3, n.5, ano 3, jan/jun 2009.

MONTEIRO, V. N; SILVA, R. N. Aplicações Industriais da Biotecnologia Enzimática. **Revista processos químicos**, Jan / Jun de 2009.

MOREIRA et al. 2002. Application of proteases from *Nocardioopsis* sp. as a laundry detergent additive. **World Journal of Microbiology e Biotechnology** 18: 307-312, 2002.

NETO, P, J, D. **Análise multivariada da forma do otólito sagita para discriminação de estoques de dourado, *Coryphaena hippurus* (Pisces Coryphaenidae), no nordeste do Brasil.** Dissertação, Programa de Pós-Graduação em Biometria da Universidade Federal Rural de Pernambuco, para obtenção do título de mestre. Recife, Pernambuco, 2005.

OLIVEIRA, E, M. **Purificação e caracterização de uma carboxipeptidase e de uma dipeptidase da larva de *Tenebrio molitor* (Coleoptera).** Dissertação, Programa de Pós-graduação em ciências biológicas (bioquímica), Universidade de São Paulo, São Paulo, 2008.

OLSON, R.J; MAGANA, F. G. Food habits and consumption rates of common dolphinfish (*Coryphaena hippurus*) in the eastern Pacific Ocean. **Fish. Bull.** 279-298 (2002).

OXENFORD, H, A. Biology of the dolphinfish (*Coryphaena hippurus*) in the western central Atlantic: a review. **Sci. Mar.**, 63 (3-4): 277-301.

PAGE, M. J.; DI CERA, E. Serine peptidases: Classification, structure and function. **Cell. Mol. Life Sci.** 65 (2008) 1220-1236.

RAO et al. 2009. Characterization of thermo-and detergent stable serine proteases from isolated *Bacillus circulans* and evaluation of eco-friendly applications. **Process Biochemistry** 44 (2009) 262-268.

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

ROTTA, M. A.; Aspectos Gerais da Fisiologia e Estrutura do Sistema Digestivo dos Peixes Relacionados à Piscicultura. **EMBRAPA**, ISSN 1517-1973, Dezembro, 2003.

SANTOS, A. C. L.; **Biologia Reprodutiva do dourado, *Coryphaena hippurus* (Linnaeus, 1758), no arquipélago de São Pedro e São Paulo, Brasil.** Dissertação (Recursos Pesqueiros e Aquicultura) Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife, Pernambuco, 2012.

- SANTOS, C. W. V; MARQUES, M. E. C; TENÓRIO, H. A; MIRANDA, E. C; PEREIRA, H. J. V. Purification and characterization of trypsin from *Luphiosilurus alexandri* pyloric cecum. **Biochemistry and Biophysics Reports** 8 (2016) 29-33.
- SILA, A; NASRI, R; JRIDI, M; BALTI, R; NASRI, M; BOUGATEF, A. Characterisation of trypsin purified from viscera of Tunisian barbell (*Barbus callensis*) and its application for recovery of carotenoproteins from shrimp wastes. **Food Chemistry** 132 (2012) 1287-1295.
- SAEKI, K; OZAKI, K; KOBAYASHI, T; ITO, S. Detergent Alkaline Proteases: Enzymatic Properties, Genes, and Crystal Structures. **Journal of Bioscience and Bioengineering** vol. 103, No.6, 501-508. 2007.
- SHAHIDI, F.; KAMIL, J. **Enzymes from fish and aquatic invertebrates and their application in the food industry.** Trends in Food Science & Technology 12 (2001) 435-464.
- 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**, n. 31, p. 772-796, 2007.
- SILVA, F. J; ESPÓSITO, S. T.; MARCUSCHI, M; RIBEIRO, K; CAVALLI, O. R; OLIVEIRA, V; BEZERRA, R. Purification and partial characterisation of a trypsin from the processing waste of the silver mojarra (*Diapterus rhombeus*) **Food Chemistry** 129 (2011) 777-782.
- TURRA, E. M.; OLIVEIRA, D. A. A.; TEXEIRA, E. A.; PRADO, S. A.; MELO, D. C.; SOUZA, A. B. Uso de medidas morfométricas no melhoramento genético do rendimento de filé da tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*). **Rev. Bras. Reprod. Anim.**, Belo Horizonte, v.34, n.1, p.29-36, jan/mar. 2010.
- UNAJAK, S; MEESAWET, P; PAEMANEE, A; AREECHON, N; ENKGAGUL, A; KOVITVADHI, U; KOVITVADHI, S; TORRINSEN, K, R; CHOOWONGKOMON, K. Characterisation of thermostable trypsin and determination of trypsin isozymes from intestine of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus* L). **Food Chemistry** 134 (2012) 1533-1541.

VASCONCELOS, V. Cianobactérias como fontes de compostos naturais de interesse biotecnológico. **Biotecnologia, Sociedade Portuguesa de Biotecnologia**, S.2 N 5, (ISSN 1645-5878) Junho de 2014.

VIEIRA, Cláudia Regina. **Extração, hidrólise e remoção de fenilalanina das proteínas da farinha de arroz**. 2007. Dissertação (Mestrado em ciências de alimentos) Universidade Federal de Minas Gerais. Belo Horizonte, MG, 2007.

VIDOTTI, R. M. LOPES, I. G. Resíduos Orgânicos Gerados na Piscicultura. **Pesquisa e Tecnologia**, vol. 13, n. 2, Jul-Dez 2016.

VILELA, E. D. S. **Análise da produção de celulose e beta glicosidase produzidas por *Streptomyces sp.*** Dissertação (Biologia), Universidade Federal de Goiás, Goiânia, Goiás, 2013.

VILLALBA, A. G. V; SUAREZ, J. C. R; SOTO, E. M. V; SANCHEZ, G. G; RUIZ, G. C; AGUILAR, R. P. Trypsin from viscera of vermiculated sailfin catfish, *Pterygoplichthys disjunctivus*, Weber, 1991: Its purification and characterization. **Food Chemistry** 141 (2013) 940-945.

ZHOU, L. Z.; RUAN, MI-MI., CAI, Q., F.; LIU, G., M., SUN, L., C. Purification, characterization and cDNA cloning of a trypsin from the hepatopancreas of ksnakehead (*Channa argus*). **Comparative Biochemistry and Physiology, Part B** 161 (2012) 247-254.