

UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALAGOAS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
Programa de Pós-Graduação em Diversidade Biológica e Conservação nos
Trópicos

RAFAEL DAVID SOUTO DE AZEVEDO

**APLICAÇÕES TECNOLÓGICAS DE MOLÉCULAS BIOATIVAS OBTIDAS A PARTIR
DE RESÍDUOS DO BENEFICIAMENTO DO CAMARÃO SETE-BARBAS**
(Xiphopenaeus kroyeri)

MACEIÓ - AL
2013

UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALAGOAS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
Programa de Pós-Graduação em Diversidade Biológica e Conservação nos
Trópicos

RAFAEL DAVID SOUTO DE AZEVEDO

**APLICAÇÕES TECNOLÓGICAS DE MOLÉCULAS BIOATIVAS OBTIDAS A PARTIR
DE RESÍDUOS DO BENEFICIAMENTO DO CAMARÃO SETE-BARBAS**
(Xiphopenaeus kroyeri)

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em
Diversidade Biológica e Conservação nos Trópicos,
Instituto de Ciências Biológicas e da Saúde. Universidade
Federal de Alagoas, como requisito para obtenção do título
de Mestre em CIÊNCIAS BIOLÓGICAS, área de
concentração em Conservação da Biodiversidade Tropical.

Orientadora: Profa. Dra Talita da S. Espósito
Co-orientador: Dr Ranilson de Souza Bezerra

MACEIÓ - AL
2013

Catlogação na fonte
Universidade Federal de Alagoas
Biblioteca Central
Divisão de Tratamento Técnico
Bibliotecária Responsável: Fabiana Camargo dos Santos

- A994a Azevedo, Rafael David Souto de.
Aplicações tecnológicas de moléculas bioativas obtidas a partir de resíduos do beneficiamento do camarão sete-barbas (*Xiphopenaeus kroyeri*) / Rafael David Souto de Azevedo. – 2013.
80 f. : il.
- Orientadora: Talita da Silva Espósito.
Co-orientador: Ranilson de Souza Bezerra.
Dissertação (Mestrado em Diversidade Biológica e Conservação) – Universidade Federal de Alagoas. Instituto de Ciências Biológicas e da Saúde. Maceió, 2013.
- Bibliografia: f. 49-56.
Anexos: f. 57-80
1. Quitosana magnética. 2. Proteases – Imobilização. 3. Pescado – Resíduos do processamento. 4. Pescado – Aproveitamento de resíduos. 5. Fatores antinutricionais. I. Título.

CDU: 597:664.959

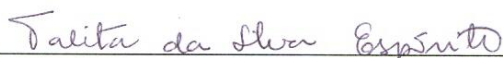
Folha de aprovação

Rafael David Souto de Azevedo

APLICAÇÕES TECNOLÓGICAS DE MOLÉCULAS BIOATIVAS OBTIDAS A PARTIR DE RESÍDUOS DO PROCESSAMENTO DO CAMARÃO SETE-BARBAS (XIPHOPENAEUS KROYERI)

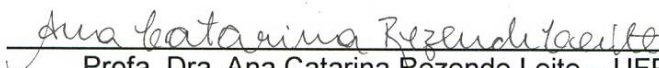
Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Diversidade Biológica e Conservação nos Trópicos, Instituto de Ciências Biológicas e da Saúde. Universidade Federal de Alagoas, como requisito para obtenção do título de Mestre em CIÊNCIAS BIOLÓGICAS, área de concentração em Conservação da Biodiversidade Tropical.

Dissertação aprovada em 06 de fevereiro de 2013.



Profa. Dra. Talita da Silva Espósito - UFAL

Orientadora



Profa. Dra. Ana Catarina Rezende Leite – UFPE
(membro titular)



Profa. Dra. Andrea Pires Fernandes – UFAL

(membro titular)



Prof. Dr. Petrônio Alves Coelho Filho – UFAL

(membro titular)

MACEIÓ - AL

Fevereiro / 2013

DEDICATÓRIA

*A Maria Edvânia Souto de Azevedo, José Gilmar de Azevedo e Maria de Lourdes Souto de Melo
Meus amados pais e avó,*

Pelo apoio e incentivo ao longo de minha vida estudantil e acadêmica.

Dedico.

AGRADECIMENTOS

Desde o início da redação desta dissertação que espero ansiosamente pelo momento em que escreveria meus agradecimentos, pois é nele que se sobressai o autor/pessoa, momento que possui uma conotação bastante diferenciada do texto científico, se é que posso ter a ousadia de chamar assim, que encontra-se nas demais páginas onde cada leitor encontrará o autor/pesquisador, assim, agradeço:

À Universidade Federal de Alagoas, UFAL, por oferecer um curso público de qualidade.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico, CNPq, agradeço pela concessão da bolsa (Processo 135143/2011-0) que financiou meu projeto e me possibilitou ter uma biblioteca mais “colorida”.

A Coordenação do Curso na pessoa da professora Dra Nídia Noemi Fabr e pela luta no âmbito do curso de Pós-gradua o de qualidade aqui na Institui o.

A Prof. Dra Talita da Silva Espósito, orientadora desse trabalho, pessoa que pacientemente me acolheu e soube lidar com todos os meus desesperos durante o mestrado. Muito obrigado!

Ao Prof Dr Ranilson de Souza Bezerra, meu co-orientador, que tão gentilmente me acolheu, me mostrou o cotidiano dos trabalhos na área de bioquímica e me ensinou, somente como os grandes fazem, pelo exemplo, que com humildade se vai sempre além.

Aos Professores Dr Vandick da Silva Batista (Delineamento a análise experimental para as Ciências Biológicas), Dra Taciana Kramer de Oliveira Pinto, Dr Petrônio Alves Coelho Filho, Dr Cláudio Luis Santos Sampaio, Dra Flávia Prado de Barros Moura (Diversidade e Conserva o de Ecossistemas no Nordeste) Dra Iracilda Maria de Moura Lima (Metodologia do Trabalho Científico) Dra Ana Claudia Mendes Malhado e Dr Richard James Ladle (Biodiversidade Neotropical e Biogeografia), Dr Márcio Amorim Efe (Biologia da Conserva o), Dr Nídia Noemi Fabr e e Dr Vandick da Silva Batista (Biologia Pesqueira), Dra Tam  Mott (Marcadores Moleculares de DNA para estudo da Biodiversidade) por contrib rem com a minha forma o profissional.

  professora Dra Ana Cláudia Mendes Malhado qualquer tipo de agradecimento aqui registrado será ínfimo diante de toda ajuda durante este curso de p s-gradua o, todavia agradeço pela inexorável considera o. Sempre lhe terei em mente como uma pessoa a quem tenho uma d vida incalculável.

A professora Dra Rosângela Alves Falcão, da Universidade de Pernambuco – UPE, Campus Garanhuns pelo incentivo ao ingresso no curso de mestrado, por todos os conselhos

ofertados e por estar sempre ali, como um porto seguro, me mostrando que tudo que acontece em nossa vida existe um porque e que o modo como lidamos com cada acontecido é que nos torna diferente dos demais. À minha segunda mãe, minha eterna gratidão.

A professora Dra Taciana Kramer de Oliveira agradeço pela oportunidade inicial sem a qual nada que construí durante o mestrado seria possível.

Aos membros de todas as bancas pelas quais passei Dra Andrea Pires Fernandes; Dr Vandick da Silva Batista, Dr Ranilson de Souza Bezerra, Dr Ian Porto Gurgel do Amaral, Dra Ana Catarina Rezende Leite e Dr Petronio Alves Coelho Filho pelo tempo dispensado para me auxiliar com suas valiosas considerações.

Aos tão amados amigos Anne Monteiro, Angélica Sabrina, Amanda Amaral, Cíntia Rafaela, Denise Sarmiento, Heline Daianne, Márcia Fernanda, Marta Aquino, Maria Araújo, Michele Nascimento, Núbia Patrícia, Fernanda Medeiros, Atanásio Neto, Raul Tavares, Ronnayse Calado, Josaniel Vieira.

À toda família do LABENZ que me acolheram e puderam tornar todas as horas no laboratório em momentos agradáveis: Anderson Henriques, Augusto Junior, Andrea Cybelle, Caio Assis, Carol Costa, Charles Junior, Fábio Marcel, Flávia Thuane, Helane Costa, Ian Porto, Janilson Felix, Juliana Santos, Julieta Xavier, Karol Lopes, Kelma Sirleide, Paula Maia, Raquel Silva, Renata França, Robson Neri, Suzan Santos, Thiago Cahú, Vagne Oliveira e Werlayne Mendes.

Agradeço aos amigos Camila Paes, Milena Carvalho e Antonio Neto por todos aqueles dias em que estivemos juntos dividindo o apartamento e a vida em Maceió. Agradeço também a Werla pelo tempo de estadia e aquelas longas conversas nossas que sempre nos ajudaram a passar o tempo.

Aos colegas de turma de mestrado Anderson Miranda, Filipe Nascimento, Gustavo Leal, João Firmino, José Neto, Lahert Araújo e Márcia Souza.

A todos vocês meu muito obrigado por tudo compartilhado nestes dois anos.

*“Nós vivemos como peixes
Com a voz que nós calamos
Com essa paz que não achamos
Todas as iscas que mordemos
Os anzóis atravessados
Nossos gritos abafados”*

Peixes – Mariana Aydar

RESUMO

A sustentabilidade nas cadeias produtivas atreladas à pesca tornou-se um dos maiores desafios para indústria pesqueira, especialmente no que concerne ao gerenciamento de resíduos do processamento do pescado, subprodutos e fauna acompanhante. Cabeça, exoesqueletos, patas e cauda são os principais resíduos que resultam do processamento de camarões, destas subunidades é possível realizar a extração de quitina e, posteriormente sua conversão em quitosana que é um biopolímero de aplicação biotecnológica extremamente ampla devido à versatilidade da molécula da quitosana. Sua aplicação em processos de imobilização de proteínas traz vantagens quando compara-se à ação de proteínas livres, inclusive com possibilidades de aplicação na detecção de fatores antinutricionais que estão presentes em diversos componentes dietários utilizados em aquicultura. No presente estudo intestinos da tilápia do Nilo foram homogeneizados com tampão fosfato a 0,05M para obtenção de proteases que foram imobilizadas em um suporte magnético de quitosana. A tripsina purificada teve peso molecular aproximado de 23kDa. O tempo ótimo para imobilização de tripsina no suporte foi de 8 horas. Uma maior atividade catalítica foi registrada em temperatura de 50°C (1.101 ± 0.0371 mμ/mg). Ao realizar a verificação dos componentes dietários que tiveram uma maior inibição da atividade catalítica da tripsina purificada observou-se uma inibição maior em ração com 25% de proteína bruta. Os testes de viabilidade da enzima imobilizada foram positivos até mais de 60 dias da enzima imobilizada isto permite afirmar que há boas possibilidades para uso das proteases imobilizadas na quitosana magnética em bioprocessos.-

Palavras-chave: Quitosana Magnética. Proteases. Imobilização. Fatores antinutricionais.

ABSTRACT

Sustainability in supply chains tied to fishing has become one of the biggest challenges for the fishing industry, especially regarding the management of fish processing waste, byproducts and accompanying fauna. Heads, exoskeleton, paws and tail are the main residues that result from processing of shrimps, these subunits can perform the extraction of chitin and later conversion into a biopolymer chitosan that is extremely broad biotechnological application because of the versatility of chitosan molecule. Its application in processes for immobilization of proteins has advantages when compared to the action of free proteins, including possibilities for application in the detection of anti-nutritional factors that are present in many dietary components used in aquaculture. In this study intestines of Nile tilapia were homogenized with 0.05M phosphate buffer to obtain proteases that were immobilized on a magnetic support chitosan. The purified trypsin had approximate molecular weight of 23 kDa. The optimal time for immobilization of trypsin in the holder was 8 hours. Greater catalytic activity was recorded at 50 ° C ($1,101 \pm 0.0371$ m μ / mg). When performing the verification of dietary components that had greater inhibition of catalytic activity of purified trypsin, it was observed a greater inhibition in feed with 25% crude protein. The tests feasibility of immobilized enzyme were positive by over 60 days of the immobilized enzyme, these results shows that are good possibilities to use the immobilized proteases on chitosan magnetic bioprocesses.

Key-word: Chitosan-magnetic. Proteases. Immobilization. Antinutritional Factors

LISTA DE FIGURAS

| | |
|--|----|
| Figura 1 - Camarão sete-barbas (<i>Xiphopenaeus kroyeri</i>) | 21 |
| Figura 2 - Árvore Genealógica do gênero <i>Xiphopenaeus</i> baseada no sequenciamento do COI-1 | 22 |
| Figura 3 - Tilápia do Nilo (<i>Oreochromis niloticus</i>) | 24 |
| Figura 4 - Produção da aquicultura brasileira entre 1980 e 2010 | 26 |
| Figura 5 - Resíduos do processamento do camarão sete-barbas | 28 |
| Figura 6 - Produção e ação das proteases intestinais | 31 |
| Figura 7 - Estrutura química da astanxantina | 33 |
| Figura 8 - Estruturas químicas da quitina e quitosana e sítios de conversão amino | 34 |

LISTA DE TABELAS

| | |
|--|----|
| Tabela 1 - Enquadramento taxonômico do camarão sete-barbas | 22 |
| Tabela 2 - Enquadramento taxonômico da Tilápia do Nilo | 24 |
| Tabela 3 - Propriedades nutricionais dos ingredientes utilizados em dietas em aquicultura | 39 |

LISTA DE ABREVIATURAS E SIMBOLOS

BAPNA - benzoil arginina α -nitroanilida

EC - Enzyme Commission

kDa - quilo Daltons

pH - potencial hidrogeniônico

SDS - sódio dodecil sulfato

SDS-PAGE - eletroforese em gel de poliacrilamida utilizando SDS

SUMÁRIO

| | |
|---|----|
| 1 APRESENTAÇÃO | 14 |
| 2 REVISÃO DE LITERATURA | 20 |
| 2.1 Espécies utilizadas no estudo | 20 |
| 2.1.1 Camarão sete-barbas (<i>Xiphopenaeus kroyeri</i>) | 20 |
| 2.1.2 Tilápia do Nilo (<i>Oreochromis niloticus</i>) | 23 |
| 2.2 Processamento do Pescado e Impactos Ambientais | 24 |
| 2.3 Obtenção de Moléculas Bioativas a partir de resíduos do processamento do pescado | 29 |
| 2.3.1 Proteases | 30 |
| 2.3.2 Carotenoides | 32 |
| 2.3.3 Quitina e Quitosana | 34 |
| 2.4 Fatores Antinutricionais | 37 |
| 2.5 Referências | 41 |
| REFERÊNCIAS GERAIS | 69 |
| ANEXOS | 73 |

1 APRESENTAÇÃO

Durante o processo de endoculturação humana foram assimiladas práticas de uso dos recursos naturais que, muitas vezes, tornaram-se inconsequentes quanto às possíveis interferências negativas no ambiente. Dados da *Food and Agricultural Organization* (FAO, 2012) mostram que em 2010 as pessoas consumiram cerca de 128 milhões de toneladas de peixe procedentes de atividades pesqueiras ou de cultivo, havendo estimativas para a produção de 172 milhões de toneladas de pescado em 2021. O Brasil tem uma costa de 8.698km, aqui a produção de pescado em 2010 foi de 1.264.765 t registrando um aumento de 2% em comparação a 2009. O nordeste é, atualmente, a região que mais produz pescado no país (MPA, 2010), algo que nos remete a importância nacional da região para a produção total aquícola. Deste total uma parcela é destinada às atividades de processamento do pescado para comercialização, como filetagem, por exemplo. Estas atividades geram montantes de resíduos que são usualmente descartados no ambiente. FERRARO *et al.* 2010 afirma que a valorização dos subprodutos resultantes destas atividades é uma questão central para sustentabilidade da indústria pesqueira.

São considerados subprodutos: cabeças, exoesqueletos, intestinos, escamas e demais resíduos que não apresentam interesse comercial direto. Estes elementos podem chegar de 30 a 80% do peso total do pescado (LIU *et al.* 2010) estando condicionada a técnica de processamento empregada e a espécie comercializada. Boa parcela destes subprodutos é descartada, ou, empregada como ingrediente na formulação de ração animal. Uma alternativa a este descarte é a agregação de valor a estas subunidades resultantes do processamento, especialmente se esta agregação estiver associada a abordagens holísticas e boas opções de gestão para estes resíduos. (STOCKHAUSEN *et al.* 2012). Tal anseio pode ser elucidado com

a obtenção de moléculas com propriedades bioativas oriundas destes resíduos de organismos aquáticos, principalmente, pois diversas propriedades peculiares destas biomoléculas são registradas. (BEZERRA *et al.* 2005; ESPÓSITO *et al.* 2009; ESPÓSITO *et al.* 2010; MARCUSCHI *et al.* 2010; FREITAS *et al.* 2012; UNAJAK *et al.* 2012).

Aplicações biotecnológicas destas moléculas são muitas, especialmente pela ampla gama de biomoléculas que podem ser obtidas como: quitina e quitosana, proteases diversas, carotenoides, astaxantina, colágeno e glicosaminoglicanos. (KUMAR, 2000; NAGAI E SUZUKI, 2000; BEZERRA *et al.* 2005; BUARQUE *et al.* 2009; CAHÚ *et al.* 2012) e há sinalizações para um futuro promissor de descobertas científicas neste âmbito. Especialmente em regiões tropicais onde os variados hábitos alimentares da ictiofauna explicam diferenças nas composições das enzimas destes peixes (FREITAS JR *et al.* 2012). Destacam-se as recentes descobertas sobre regenerações neurológicas e no combate a hepatite B com esqualamina (ZASLOFF *et al.* 2011; GOLDSHMIT *et al.* 2012). Dentre os diversos empregos para estes biomateriais sobressaem sua utilização nas indústrias de detergentes, alimentos e fármacos (MOREIRA *et al.* 2002; ESPÓSITO *et al.* 2010; SINGH *et al.* 2011) que integram uma parcela alta do destino final destes produtos biológicos.

As características já reportadas de alta durabilidade, elevada biocompatibilidade, baixa toxicidade, atividade antibacteriana e em procedimentos cromatográficos (SHI *et al.* 1996; JAYACUMAR *et al.* 2011) agregam importância biológica, médica e biotecnológica à quitosana que é um exemplo de biomolécula que pode ser obtido diretamente de resíduos do processamento de camarões. Há possibilidades de emprego de quitosana para imobilização de proteínas, para tanto SINGH *et al.* 2011 sugere que o produto desacetilado da quitina pode ser considerada a matriz ideal para imobilização de enzimas. Tal característica é possibilitada devido à presença de diversos sítios reativos presentes na estrutura molecular da quitosana.

Biologicamente este complexo enzima-quitosana pode ser empregado na detecção de fatores antinutricionais presentes em diversas rações comerciais utilizadas em aquicultura, especialmente de inibidores de proteases que são os mais importantes fatores antinutricionais presentes nas rações para peixe (BAJPAI *et al.* 2005). A presença destes fatores surge de componentes proteicos alternativos e são responsáveis por diversos efeitos nos peixes de cultivo, desde o acúmulo de gordura visceral até o desenvolvimento de doenças. (VAN DEN INGH *et al.* 1991; URAN *et al.* 2008; CHIKWATI *et al.* 2012). Assim, compreender a presença destes compostos nos componentes dietários ofertados para peixes de cultivo traz informações valiosas sobre o estado nutricional de peixes e saúde digestiva dos peixes de cultivo.

REFERÊNCIAS

- BAJPAI, S.; SHARMA, A.; GUPTA, M.N.; Removal and recovery of antinutritional factors from soybean flour. **Food Chemistry** 89 497–501 2005.
- BEZERRA, R.S.; SANTOS, J.F.; PAIVA, P.M.G.; CORREIA, M.T.S.; COELHO, L.C.B.B.; VIEIRA, V.L.A. *et al.* Partial purification and characterization of a thermostable trypsin from pyloric caeca of tambaqui (*Colossoma macropomum*). **Journal Food Biochemistry** 25(3):199–210. 2001.
- BEZERRA, R. S., LINS, E. J. F., ALENCAR, R. B., PAIVA, P. M. G., CHAVES, M. E. C., COELHO, L. C. B. B., *et al.* Alkaline proteinase from intestine of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). **Process Biochemistry**, 40, 1829–1834. 2005.
- BUARQUE, D. S.; CASTRO, P. F.; SANTOS, F. M. S.; *et al.* Digestive peptidases and proteinases in the midgut gland of the pink shrimp *Farfantepenaeus paulensis* (Crustacea, Decapoda, Penaeidae). **Aquaculture Research**. 40, 861-870.2009.
- CAHÚ, T. B.; SANTOS, S. D.; MENDES, A.; *et al.* Recovery of protein, chitin, carotenoids and glycosaminoglycans from Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) processing waste. **Process Biochemistry** 47 570–57. 2012.
- CHIKWATI, E.; VENOLD, F.F.; PENN, M.H. *et al.* Interaction of soyasaponins with plant ingredients in diets for Atlantic salmon, *Salmo salar* L. **British Journal of Nutrition** 107, 1570–1590, 2012.
- ESPÓSITO, T. S.; MARCHUSCHI, M.; AMARAL, I. P. G. *et al.* Trypsin from the Processing Waste of the Lane Snapper (*Lutjanus synagris*) and Its Compatibility with Oxidants, Surfactants and Commercial Detergents. **J. Agric. Food Chemistry**. 58, 6433–6439. 2010.
- FAO (Food and Agricultural Foundation of the United Nations). The State of World Fisheries and Aquaculture 2012. Roma, Itália. Junho. 2012.

FERRARO, V.; CRUZ, I. B.; JORGE, R. F. *et al.* Valorisation of natural extracts from marine source focused on marine by-products: A review. **Food Research International** 43, 2221–2233. 2010.

FREITAS-JÚNIOR, A. C. V.; COSTA, H. M. S.; ICIMOTO, M. Y. ; *et al.* Giant Amazonian fish pirarucu (*Arapaima gigas*): Its viscera as a source of thermostable trypsin. **Food Chemistry** 133 1596–1602. 2012.

GOLDSHMIT, Y.; SZTAL, T. E.; JUSUF, P. R. *et al.* Fgf-Dependent Glial Cell Bridges Facilitate Spinal Cord Regeneration in Zebrafish. **The Journal of Neuroscience**. 32(22): 7477-7492. 2012.

JAYAKUMAR, R.; PRABAHARAM, M.; KUMAR, P. T. S.; *et al.* Biomaterials based on chitin and chitosan in wound dressing applications. **Biotechnology Advances** 29 (2011) 322–337.

KUMAR, M., N., V., R. A review of chitin and chitosan applications. **React Funct Polym** 2000; 46:1–27.

LIU, G.; CAO, M.; YU, H. *et al.* Optimisation of enzymatic hydrolysis of the by-products of marine crab processing using mixed enzymes. **International Journal of Food Science and Technology**. 45, 1198–1204. 2010.

MARCUSCHI, M., ESPÓSITO, T. S., MACHADO, M. F. M., HIRATA, I. Y., MACHADO, M. F. M., SILVA, M. V., *et al.* Purification, characterization and substrate specificity of a trypsin from the Amazonian fish tambaqui (*Colossoma macropomum*). **Biochemical and Biophysical Research Communications** 396, 667–673. 2010.

MOREIRA, K. A., ALBUQUERQUE, B. F., TEIXEIRA, M. F. S., PORTO, A. L. F., & LIMA FILHO, J. L. Application of protease from *Nocardiosis* sp. as a laundry detergent additive. **World Journal of Microbiology & Biotechnology**, 18, 307–312. 2002.

NAGAI T. AND SUZUKI N. Isolation of collagen collagen from the outer skin waste material of cuttle from fish waste material-skin, bone and fins. **Food Chemistry** 68, 277-281. 2000.

SHI, Y.; JIANG, Y.; SUI, D.; et al. Affinity chromatography of trypsin using chitosan as ligand support. **Journal of Chromatography A**, 742 (1996) 107-112.

SINGH, A.N., et al., Glutaraldehyde-Activated Chitosan Matrix for Immobilization of a Novel Cysteine Protease, Procerain B. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 59(11): 6256-6262. 2011.

STOCKHAUSEN, B.; OFFICER, R. A.; SCOTT, R. Discard mitigation – what we can learn from waste minimization practices in other natural resources?. **Marine Policy** 36 (2012) 90–95.

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**. 112 125–130. 2009.

UNAJAK, S.; MEESAWAT, P.; PAEMANEE, A.; AREECHON, N. *et al.* Characterisation of thermostable trypsin and determination of trypsin isozymes from intestine of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus* L.). **Food Chemistry**.134(1), 1533–1541. 2012.

URAN, P.A.; GONCALVES, A.A.; TAVERNE-THIELE, J.J.; et al. Soybean meal induces intestinal inflammation in common carp (*Cyprinus carpio* L.). **Fish Shellfish Immunology** 25, 751–760. 2008.

VAN DEN INGH, T.S.G.A.; KROGDAHL, A.; OLLI, J.J.; HENDRIKS, H.G.C.J.; KONINKX, J.G.J.F. Effects of soybean-containing diets on the proximal and distal intestine in Atlantic salmon (*Salmo salar*) – a morphological study. **Aquaculture** 94, 297–305. 1991.

ZASLOOFF, M.; ADAMS, A. P.; BECKERMAN, B. et al. Squalamine as a broad-spectrum systemic antiviral agent with therapeutic potential. 15978–15983. **PNAS**. 108 38. 2011.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Espécies utilizadas no estudo

2.1.1 Camarão Sete-Barbas (*Xiphopenaeus kroyeri*)

O camarão sete-barbas (Figura 1) foi descrito primeiramente por Heler em 1862 que o nomeou como *Penaeus kroyeri* e posteriormente foi enquadrado no gênero *Xiphopenaeus* por Smith em 1869. É uma espécie de considerável importância comercial e o maior registro de captura deu-se em 2001, onde, segundo informações da FAO (*Food and Agriculture Organization of the United Nations*), a produção global alcançou 50 toneladas. No Atlântico ocidental, *X. kroyeri* é um dos camarões nativos mais comuns (GUSMÃO *et al.* 2006). Em Alagoas o principal ponto de pesca da espécie é o Pontal do Peba.

As populações de *X. kroyeri* são encontradas normalmente entre 1 e 25 metros e em áreas próximas aos estuários dos rios e não apresenta estratificação populacional. Possui ciclo de vida relativamente curto (em torno de 25 meses) e observando-se as condições de temperatura, salinidade e oxigênio dissolvido conclui-se que o intervalo destas condições é muito baixo possibilitando o enquadramento desta espécie como sendo estenotópica: Temperatura °C (22 a 27), Nitrato umol/L 0,32 a 2,04, Salinidade PPS 34 a 36, oxigênio ml/L 4,227-4,855 Fosfato umol /L 0,110-0,264 e Silicato umol/l 0,756-5,794.

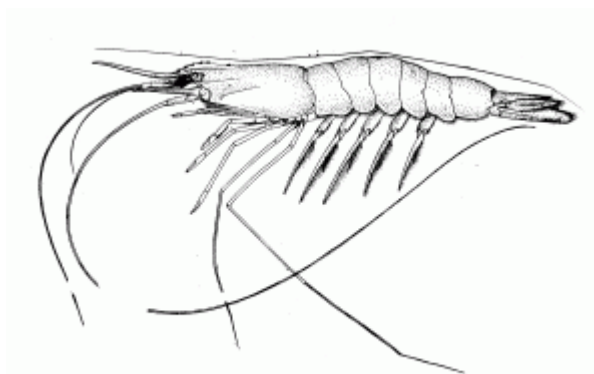


Figura 1 - Camarão sete barbas (*Xiphopenaeus kroyeri*) Foto: www.fao.org

No que concerne a sua distribuição geográfica *X. kroyeri* é encontrado no Oceano Atlântico desde a Carolina do Norte (EUA) até o estado de Santa Catarina (Brasil). Tendo seu espectro de distribuição ampliado até o Rio Grande do Sul (D'INCÃO E REIS, 2002). De modo que nota-se que a espécie não possui um padrão disjunto de distribuição ao longo da América do Norte, Central e Sul.

É importante interpretar que a formação do Ístimo do Panamá é, possivelmente, responsável pela vicariância do gênero onde *X. kroyeri* ocorre nas águas do Atlântico e *Xiphopenaeus riveti* (espécie já classificada como sinonímia de *X. kroyeri*) ocorre nas águas no pacífico.

A princípio, *Xiphopenaeus kroyeri*, descrito por Heller, 1862, e *Xiphopenaeus riveti*, descrito por Bouvier, 1907, foram classificados como espécies diferentes que integram o mesmo gênero. Em 1997 Pérez enquadrou as duas espécies como pertencentes, na verdade, a uma única espécie, afirmando que *Xiphopenaeus* é um gênero monotípico, uma vez que não há características morfológicas suficientes que possibilitem a separação entre as espécies do Atlântico e do Pacífico.

A partir do sequenciamento do DNA entre as espécies *X. kroyeri* e *X. riveti*, GUSMÃO *et al.* 2006 demonstra que na realidade o gênero possui três espécies onde *X. riveti* ocorre ao longo do Oceano Pacífico e as demais espécies (sp1 e sp2 de *X. kroyeri*) ocorrem o oceano Atlântico. Assim, a árvore genealógica do gênero é descrita com base no sequenciamento das izoenzimas do Citocromo oxidase subunidade 1 – COIX (mitocondrial). (Figura 2).

O aspecto da pesca que não considere a existência destas duas espécies nas águas brasileiras constitui-se como uma possível ameaça para conservação destes organismos. Afinal, um gerenciamento que não esteja adequado para estes camarões pode levar a

população ao colapso. Merece atenção, no Brasil, os estados de São Paulo e Rio Grande do Norte que são os únicos do país a registrarem a sp2 de *Xiphopenaeus*.

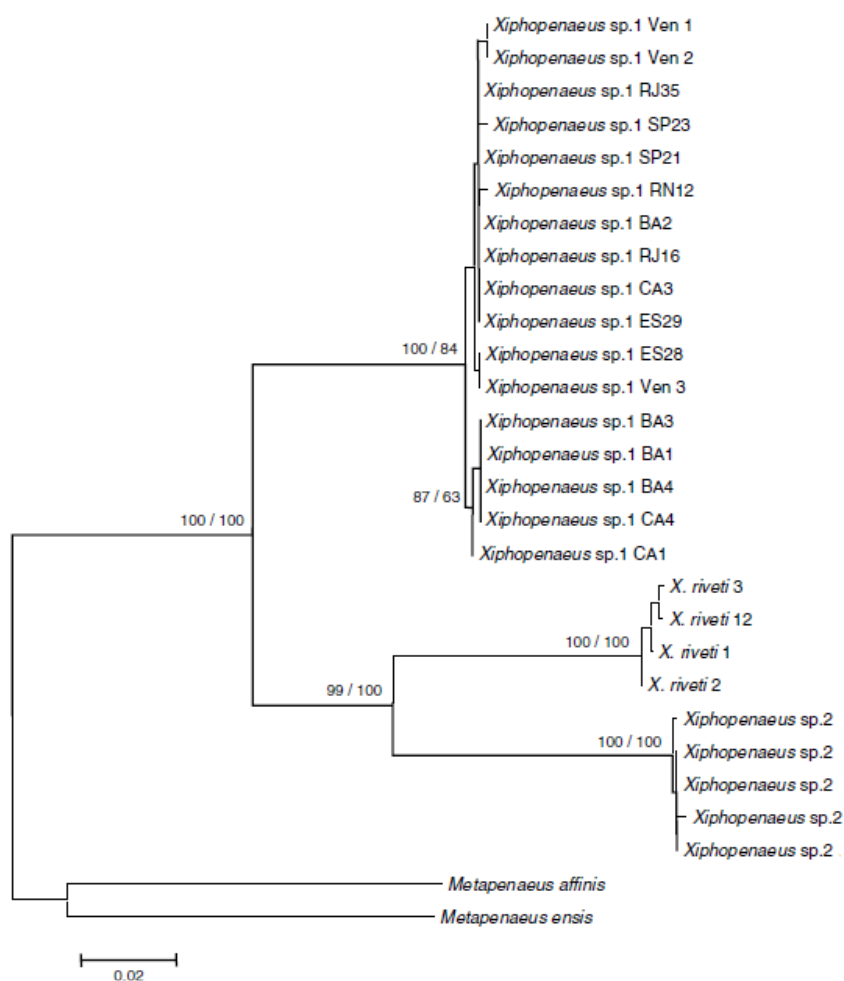


Figura 2 - Árvore genealógica do gênero *Xiphopenaeus* baseada no sequenciamento do COI-1. Gusmão *et al*, 2006.

Xiphopenaeus kroyeri é enquadrada taxonomicamente do seguinte modo:

| | |
|--------------------|--------------------------------|
| Reino | Animalia |
| Filo | Arthropoda |
| Sub-Filo | Crustacea (Brünnich, 1772) |
| Classe | Malacostraca (Latreille, 1802) |
| Sub-classe | Eumalacostraca (Grobber, 1892) |
| Super-ordem | Eucarida (Calman, 1904) |
| Ordem | Decapoda (Latreille, 1802) |

| | |
|----------------------|--|
| Sub-ordem | Dendrobranchiata (Rate 1888) |
| Super-família | Penaeoidea (Rafinesque, 1815) |
| Família | Penaidae (Rafinesque, 1815) |
| Gênero | <i>Xiphopenaeus</i> (Smith, 1869) |
| Espécie | <i>Xiphopenaeus kroyeri</i> (Heller, 1862) |

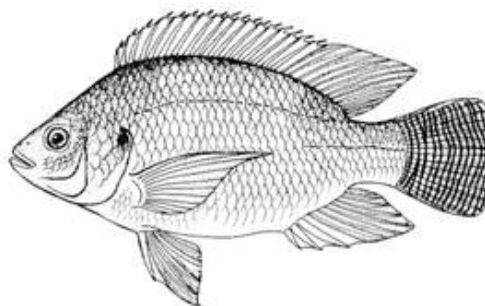
Tabela 1 - Enquadramento taxonômico do camarão sete-barbas (*Xiphopenaeus kroyeri*).

2.1.2 Tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*)

Os primeiros registros da tilápia no Brasil datam da década de 50 com a introdução de *Tilapia rendalli* no estado de São Paulo. A tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) (Figura. 3), propriamente dita, só foi introduzida no país 20 anos mais tarde, na região Nordeste. Atualmente a tilápia junto com a carpa (*Cyprinus carpio*) são as espécies de peixe mais cultivadas, respondendo juntas por mais de 60% da produção aquícola nacional (MPA, 2010).

Segundo dados da FAO, em 2010, a produção global em aquicultura da tilápia ultrapassou 2,5 toneladas o que consolida a afirmação de que a espécie é um dos principais alicerces quando se fala em cultivo de peixes no mundo inteiro. Dentre as inúmeras vantagens que permeiam a ampla aceitação da tilápia pela aquicultura e pelos consumidores está a boa textura da carne, ausência de microespinhas, fácil filetagem e bom aceite de ração (BOLL *et al.* 1995; BOSCOLO *et al.* 2004).

Esta espécie apresenta hábitos alimentares bastante diversos onde o local, o tempo e o sexo influenciam o comportamento alimentar (BEVERIDGE E BAIRD, 2000). Fitoplâncton, perifíton, algas, meiofauna, invertebrados compõem a dieta deste peixe no ambiente, aspectos que reforçam o potencial para cultivo de tilápias em muitas regiões tropicais e subtropicais. (SAYED, 1998).



Fiura. 3 - Tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) Foto: www.fao.org

| | |
|----------------|------------------------------|
| Reino | Animalia |
| Filo | Cordata |
| Classe | Actinopterygii |
| Ordem | Perciformes |
| Família | Cichlidae |
| Gênero | <i>Oreochromis</i> |
| Espécie | <i>Oreochromis niloticus</i> |

Tabela 2 - Enquadramento taxonômico da tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*).

2.2 Processamento do Pescado e Impactos Ambientais

Os primeiros registros de processamento do pescado, mesmo que muito precários, datam de 2.000 a.C. em textos de Homero, com atividades de salga, seguidas apertização e conservação pelo frio, todos voltados somente para uma maior durabilidade dos produtos capturados. Hoje, os principais objetivos do processamento do pescado permeiam pelo desenvolvimento de novos produtos e agregação de valor a matéria-prima original.

Atendendo as demandas do mercado consumidor surgiram variadas técnicas de processamento do pescado, estas, em sua maioria, visando facilitar a aceitabilidade, além possibilitar aumento no lucro final do produto. A aceitação do produto de pescado é

dependente de uma adequada manipulação e um processamento que atenda as necessidades dos consumidores.

Merece atenção que as etapas de processamento do pescado geram resíduos que usualmente não são comercializados e conseqüentemente são descartados. A minimização no descarte destes resíduos tem adquirido grande importância, especialmente devido a possibilidade de reconciliação dos interesses biológicos, econômicos e sociais através de abordagens holísticas (STOCKHAUSEN *et al.* 2012), afinal estes subprodutos vem causando problemas ambientais devido ao seu acúmulo no ambiente. (ISLAM *et al.* 2004).

A filetagem, salga e defumação geram o maior montante de resíduos e subprodutos chegando a 75% do peixe e estima-se que algo entre 8 e 25% do total de capturas mundiais é desperdiçado com resíduos do processamento, subprodutos e fauna acompanhante (FERRARO *et al.* 2010; STOCKHAUSEN *et al.* 2012). É importante frisar que há vultosa carência quanto aos possíveis impactos destes resíduos no ambiente, todavia a caracterização destes é particularmente importante, não somente para proteção dos ecossistemas, mas também para um futuro sustentável das atividades pesqueiras. (ISLAM *et al.* 2004).

Considerando a aquicultura, Arvanitoyanis e Kassaveti (2008) afirmam que o cultivo de peixes possui muitos efeitos negativos no ambiente ponto que aumenta a necessidade de gestão e proteção dos ambientes aquáticos. No Brasil, aonde a aquicultura vem crescendo consideravelmente (Figura. 4) é clara a necessidade de mensurações sobre os possíveis impactos destes resíduos do processamento do pescado no ambiente, principalmente pelo aumento expressivo observado no cenário nacional.

Os impactos no ambiente estão condicionados às espécies cultivadas, ao método de cultivo empregado, às condições hidrográficas e ao tipo de alimentação empregada. (WU, 1995). Adsorve-se a ideia de uma cascata de impactos ambientais que vão desde animais de sedimento a estruturas maiores como esponjas e corais. (SIMPSON E WATLING, 2006).

Diversos conflitos da piscicultura com outros usos do ambiente costeiro como recreação, pesca e navegação, são registrados, além da destruição destes ambientes que resulta em perdas de berçários marinhos, remoção de estruturas biológicas pela pesca e consequente considerável perda de biodiversidade. (WU, 1995; SIMPSON E WATLING, 2006).

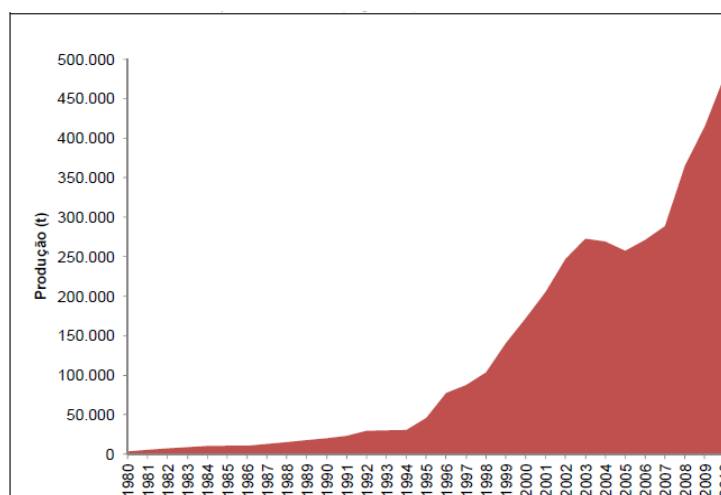


Figura. 4 - Produção da aquicultura brasileira entre 1980 e 2010 (MPA, 2010).

Economicamente falando, Anon (2009) realiza um paralelo entre os benefícios biológicos e econômicos de uma minimização efetiva do desperdício de subunidades pesqueiras, o que reforça a necessidade de um descarte dependente de reações econômicas ou regulamentárias (STOCKHAUSEN *et al.* 2012). Destaca-se ainda que agregar valor aos diversos componentes que podem ser obtidos de subprodutos podem ser economicamente mais atrativo do que os produtos alvo (FERRARO *et al.* 2010).

O gerenciamento destes resíduos lançados no ambiente requer alternativas próprias especialmente pela alta perecibilidade e pela ação de microorganismos com ótimo crescimento médio (FERRARO *et al.* 2010), como *Pseudomonas* spp, *Salmonella* spp. e *Listeria* spp. (KARUNASAGAR E KARUNASAGAR, 2000; ISLAM *et al.* 2004). Algo que preocupa pela possibilidade de crescimento descontrolado de microorganismos que afetem negativamente a aquicultura mundial.

A produção mundial de camarões é alta e atrelada à essa alta produção está o processamento de camarões para obtenção do filé, que possui amplo mercado consumidor. O desperdício dos chamados subprodutos do processamento do camarão (cabeça, exoesqueleto e cauda) pode chegar até 70% do peso da matéria prima (HOLANDA E NETTO, 2006).

Algo preocupante, primeiramente pela geral não quantificação do descarte, e a posteriormente pelos possíveis impactos destes resíduos no ambiente. Como exemplo, podemos citar que uma indústria de processamento de camarões no Mississippi produziu em 1998 cerca de 6 mil toneladas de resíduos (ISLAM *et al.* 2004). No Brasil o camarão sete-barbas foi o camarão mais capturado no país em 2010 com um total de 15.276 t. (MPA, 2010).

No caso da tilápia as etapas que envolvem o seu processamento visam, em sua maioria, a obtenção do filé para comercialização. Enumera-se a textura da carne, fácil filetagem e bom aceite pelo mercado consumidor como os principais motivos para o atual espaço deste peixe no comércio de organismos aquáticos mundial. Em linhas gerais o processamento para produção de filé tilápia envolve depuração, jejum, insensibilização, sangria, evisceração e retirada da pele (MACARI, 2007).

Uma vez que a produção mundial de tilápia ultrapassa 2,5 t (FAO, 2010) e a maior parte do peixe é descartada com vísceras, pele e carcaça é possível realizar uma estimativa o quando é rejeitado e, usualmente, lançado no ambiente. Principalmente porque algo entre 62 e 66% do peso total do peixe é desperdiçado quando se considera a filetagem da tilápia (BOSCOLO *et al.* 2001). Há possibilidade de agregação de valor a estas subunidades do processamento da tilápia por meio da obtenção de biomoléculas, como enzimas, o que pode contribuir para um desenvolvimento sustentável das atividades das atividades pesqueiras (ISLAM *et al.* 2004; FERRARO *et al.* 2010; SILVA *et al.* 2011).



Figura 5 - Resíduos do processamento do camarão sete-barbas. (Foto: Espósito, T. S.)

O aproveitamento destes subprodutos representa uma boa alternativa, não poluente, para indústria de alimentos. (KOTZAMANIS *et al.* 2001). Aspecto que oferta, com qualidade, subsídios para elaboração de estratégias efetivas de uso integrado e sustentável dos recursos naturais, ponto fundamental para sustentabilidade das atividades pesqueiras tal como conhecemos. (SILVA *et al.* 2011; ISLAM *et al.* 2004, FERRARO *et al.* 2010).

2.3 Obtenção de Moléculas Bioativas a partir de resíduos do processamento do pescado

A bioprospecção associada a organismos aquáticos é crescente no país e no mundo. Processo que associado a novos métodos científicos de investigação vem trazendo excelentes resultados para o campo biotecnológico marinho e continental.

No país diversas fontes vêm sendo exploradas para fins comerciais como a síntese de análogos para obtenção de fármacos, cultura de células e proteínas recombinantes (BRASIL, 2010), além de diversas enzimas e polissacarídeos com ampla aplicação biotecnológica (BEZERRA *et al.* 2005; ESPÓSITO *et al.* 2010; CAHÚ *et al.* 2012). Mais de 1000 biomoléculas de organismos aquáticos foram isoladas no mundo inteiro apenas no ano de 2007, dado que demonstra o enorme e, ainda desconhecido, potencial biotecnológico advindo dos organismos aquáticos (BLUNT *et al.* 2010).

No Brasil grande parte do início dos incentivos a pesquisa biotecnológica marinha estiveram associados a iniciativas do Ministério da Ciência e Tecnologia (MCT), da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal e Nível Superior (CAPES) e do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) estando diretamente ligados às iniciativas do Comitê Executivo para o Levantamento e Avaliação do Potencial Biotecnológico da Biodiversidade Marinha (Biomar) criado em 2005 que teve como meta avaliar o potencial biotecnológico dos organismos marinhos existentes nas áreas marítimas sob jurisdição e de interesse nacional brasileiro (BRASIL, 2010).

Um dos principais serviços do campo biotecnológico é a oferta de novos produtos para serem comercializados ou aplicados em escala industrial. Atualmente, só nos Estados Unidos mais de 87 empresas atuam diretamente na comercialização de bioprodutos obtidos de organismos aquáticos. No Brasil cerca de 120 empresas são listadas como parceiras públicas ou privadas de grupos de pesquisa que atuam com Biotecnologia Marinha (BRASIL, 2010)

algo que demonstra o interesse nacional nos compostos bioativos obtidos. Principalmente considerando suas aplicações em fármacos e na indústria de alimentos. Entretanto, ao se realizar um paralelo com o número de pesquisadores que atuam na área constata-se o quando ainda é preciso evoluir neste aspecto.

Diversas biomoléculas podem ser obtidas diretamente de resíduos algo que se constitui uma alternativa à obtenção direta citada nos exemplos anteriores, além de pôr em prática as discussões mundiais sobre agregação de valor a subprodutos da indústria pesqueira em consonância com princípios ambientais e econômicos.

A redução no montante descartado pode ser realizada através de melhoramentos tecnológicos (STOCKHAUSEN *et al* 2012) por meio da obtenção de diversas biomoléculas como ácidos graxos polinsaturados, aminoácidos (taurina e creatina), quitina, quitosana e outros oligômeros, colágeno e gelatina, carotenoides, diversas proteínas e enzimas (FERRARO *et al.* 2010).

2.3.1 Proteases

São consideradas proteases (E.C. 3.4) as enzimas que realizam o processo de clivagem associado às proteínas, sendo o grupo mais importante de enzimas industriais (MOREIRA *et al.* 2002), especialmente devido às suas aplicações no mais variados setores. Dependendo da sua faixa de pH de atuação elas podem ser classificadas em proteases neutras, alcalinas ou ácidas. (NORRIS E RAO *et al.* 1998).

Em teleósteos as proteases digestivas são amplamente encontradas nas suas vísceras, um dos principais resíduos deixados pela indústria pesqueira (ESPÓSITO, 2006) o que

viabiliza a agregação de valor a este resíduo, sobretudo pela possibilidade de purificação destes biocompostos.

No intestino estas proteases auxiliam na degradação de proteínas para que aminoácidos e proteínas sejam melhor aproveitados (BEZERRA *et al.* 2001). Sua atuação no organismo (Figura 6) ocorre em cascata até uma completa degradação das proteínas obtidas na dieta.

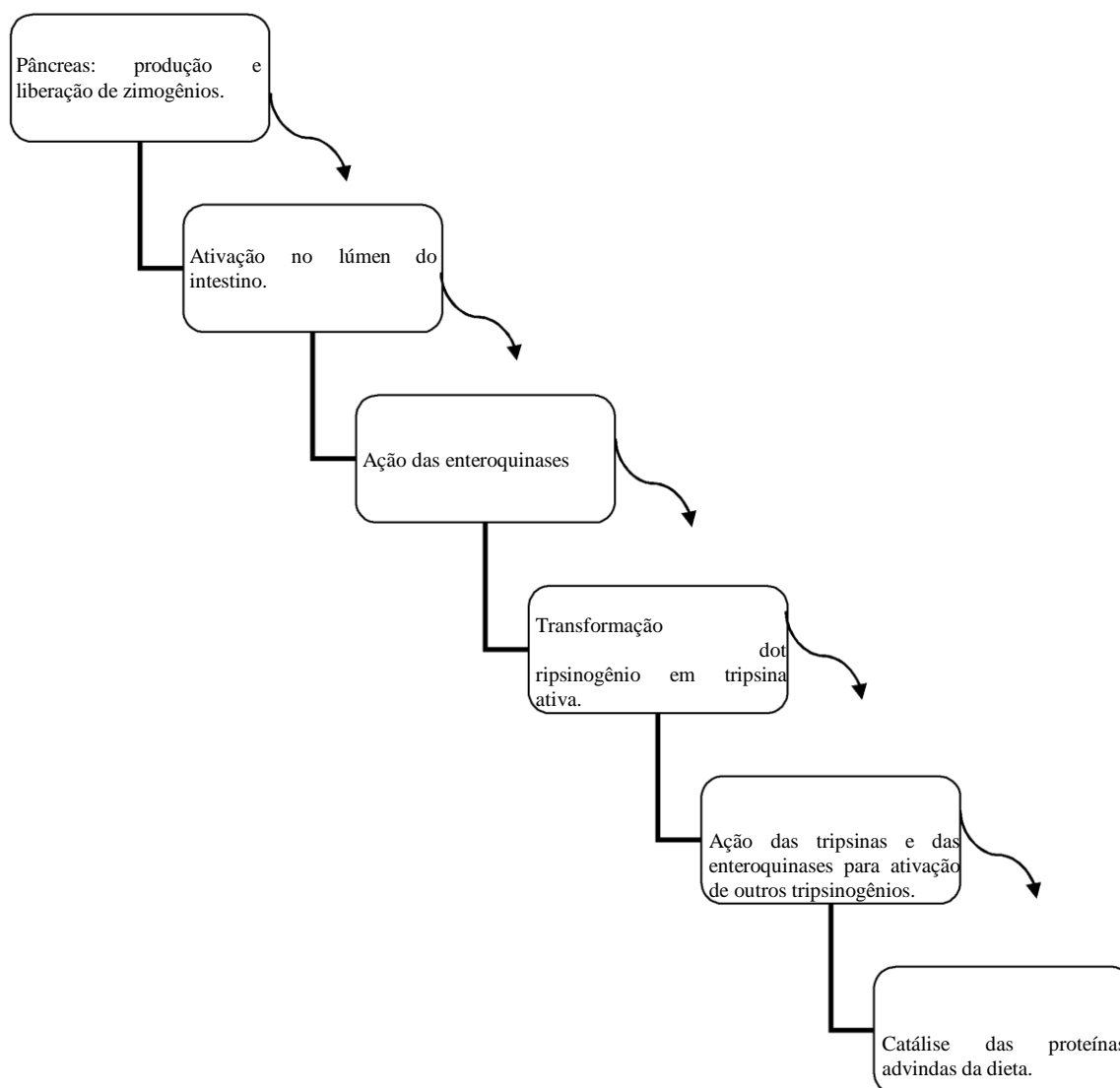


Figura 6 - Produção e ação das proteases intestinais. (Adaptado Espósito, 2006).

Mundialmente diversas pesquisas vêm sendo conduzidas visando a compreensão e potenciais aplicações de proteases de peixes. Os primeiros registros datam de 1940 com a cristalização de uma proteína de salmão (ELAM, 1940), hoje mais de 2.000 artigos já são registrados em bases de dados como o *Web of science* sobre o tema.

Entretanto, ainda há uma infinidade de respostas a serem equacionadas, principalmente sobre as diferenças entre as proteases de peixes de regiões tropicais e suas potenciais aplicações (FREITAS JR *et al.* 2012), ponto que demonstra a necessidade de maiores investigações na área sobretudo na região nordeste que assinala a maior produção de pescado do país (410.532 t) (MPA, 2010).

2.3.2 Carotenoides

Os pigmentos carotenoides englobam uma série de compostos que estão associados quimicamente ao caroteno. Na natureza são extensivamente encontrados em diversas espécies vegetais e em alguns animais.

Funcionalmente são extremamente importantes na alimentação por serem precursores da vitamina A, adsorvem-se à sua importância as recentes descobertas de que estes biopigmentos estão associados a sérios problemas de saúde como osteoporose, complicações cardíacas e câncer (RICCIONI *et al.* 2011; SUGIURA *et al.* 2012; TANAKA *et al.* 2012).

Cerca de 750 pigmentos carotenoides são registrados na natureza, destes 250 tem origem marinha (MAOKA, 2011) aspecto que denota a importância da bioprospecção destes compostos.

2.3.3 Quitina e quitosana

A celulose é, sem dúvidas, o polissacarídeo mais abundante na natureza, seguido pela quitina que é encontrada em diversos grupos animais. A biodisponibilidade de quitina no ambiente pode chegar a 10 gigatoneladas por ano (AZEVEDO *et al.* 2007) sendo a quitina a precursora de uma biomolécula de extrema importância para processos biotecnológicos, a quitosana. Quimicamente estes dois biocompostos são semelhantes sendo constituídos por sequências 2-acetamido-2-deoxi-D-glicopiranosose e 2-amino-2-deoxi-D-glicopiranosose unidas por ligações glicosídicas $\beta(1-4)$ (Figura 8) diferenciando-se, somente, pela presença de grupamentos aminos que resultam do processo de N-desacetilação. É importante destacar que há diferenças moleculares entre a quitina e a quitosana que ainda não são bem conhecidas e que o conhecimento destas diferenças é fundamental para sua aplicação em sistemas biológicos (KUMIRSKA *et al.* 2011).

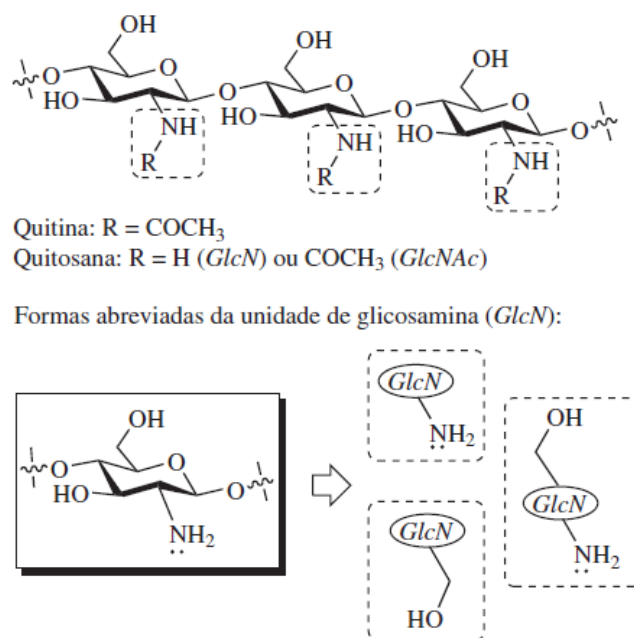


Figura 8 - Estruturas químicas da quitina e quitosana e sítios que conversão amino. (Gonsalves *et al.* 2011).

O principal fator que torna a quitosana tão interessante para emprego em processos biotecnológicos é sua “plasticidade” molecular principalmente associada às cargas elétricas da molécula e suas características de biodegradabilidade e biocompatibilidade.

Nos últimos anos a comunidade científica mundial está focada no uso de materiais biologicamente derivados como a quitosana por serem capazes de serem empregados em processo de cura molecular em níveis celulares e sistêmicos, além da aplicação em purificação de águas residuárias, remoção de poluentes, imobilização de enzimas, crescimento de macrófagos com atividade tumoricida, biomembranas, cicatrização de feridas, atividade antimicrobiana, liberação de biocompostos e técnicas cromatográficas (SHI *et al.* 1996; YUSOF *et al.* 2003; PRADO *et al.* 2011; JAYACUMAR *et al.* 2011; KUMIRSKA *et al.* 2011)

Um dos empregos interessantes para a quitosana é em processos tecnológicos de bioimobilização de moléculas bioativas, como por exemplo as enzimas que são catalisadores biológicos são específicos e aumentam extraordinariamente a velocidade das reações bioquímicas (ESPÓSITO, 2006).

Um ponto comum na utilização de enzimas é que estas não são gastas durante o processo de catálise (NELSON E COX, 2011), podendo assim ser reaproveitadas. Entretanto como a maioria das reações catalíticas ocorrem em meios aquosos as enzimas “se perdem” no meio líquido o que dificulta seu reuso.

Assim, a imobilização de enzimas, é uma técnica que permite a adaptação da molécula a mudanças no ambiente em que se encontra comparando-se com a enzima livre (KRAJEWSKA, 2004), além de permitir múltiplos reusos e um contínuo processamento (KURTOVIC *et al.* 2011). Diversos métodos de imobilização de biomoléculas podem ser

citados, como: adsorção física, ligação iônica, ligação por metais, enclausuramento, ligação cruzada e ligação covalente (AMARAL, 2007).

O uso de polissacarídeos naturais, como celulose e quitosana, têm sido extensivamente utilizados para este fim. Acrescenta-se que a quitosana, de todos suportes utilizados para imobilização de enzimas, apresenta inquestionáveis vantagens (LIU *et al.* 2010). Principalmente para emprego em processos biotecnológicos para purificação de substratos ou inibidores. Havendo condições de uso na identificação de fatores antinutricionais em rações para peixe.

2.4 Fatores antinutricionais presentes em rações

O consumo mundial de pescado é crescente, para atender a demanda surgiu a necessidade de cultivar organismos aquáticos para atender aos objetivos humanos. Atualmente a aquicultura envolve basicamente piscicultura, malacultura, carcinicultura, algicultura, ranicultura e criação de jacarés. O Brasil tem potencial para cultivo de mais de 40 espécies, sendo a tilápia, carpa, tambaqui, tambacu e pacu as espécies mais cultivadas correspondendo a 88% da produção aquícola nacional (MPA, 2010).

Um aspecto de elevada importância quando se considera a aquicultura é a alimentação que depende do modo de cultivo é desenvolvido. Em sistemas semi-intensivos a alimentação natural é apenas complementada com ração. Por outro lado em sistemas de criação intensivos toda a alimentação dos animais é oriunda das rações ministradas pelo criador (SILVA, 2010).

Torna-se possível a interpretação de que os componentes dietários ministrados sejam balanceados e que atendam a necessidade do animal criado, principalmente por serem, muitas vezes, determinantes da rentabilidade e da produtividade da criação, é importante destacar que a alimentação envolve custos consideráveis, especialmente pela inclusão de ingredientes proteicos nas rações o que representa mais de 50% do custo da ração (FURUYA *et al.* 2001).

Os ingredientes utilizados na formulação das mais variadas rações são fundamentais para um bom desempenho zootécnico dos animais, devida a rápida expansão da aquicultura fez-se necessária a busca por novos ingredientes para serem utilizados na ração. Neste sentido, componentes vegetais passaram a ser incluídos por conterem bons índices proteicos e um perfil equilibrado de aminoácidos (BAJPAI *et al.* 2005). Todavia encontrar fontes alternativas de proteína com baixo custo e alta qualidade tornou-se um dos maiores

desafios para nutrição de peixes, pois é importante que o balanceamento de energia, aminoácidos e ácidos graxos seja mantido com esta inclusão de ingredientes alternativos (DAVIS E ARNOLD, 2000; KOTZAMANIS *et al.* 2001).

Os ingredientes vegetais nas rações são variáveis nas concentrações de proteína e apresentam palatabilidade baixa (DREW *et al.* 2007), além de fatores antinutricionais que influenciam na utilização do alimento pelo animal de cultivo. Estes fatores antinutricionais são classificados em fatores que influenciam a utilização e digestão proteica, que influenciam a utilização mineral, antivitaminas e substâncias mistas (FRANCIS *et al.* 2001).

São considerados fatores antinutricionais qualquer composto que interfira na utilização plena no alimento pelo animal que o processe. São exemplos destes compostos antinutritivos fitatos, taninos, lectinas, compostos antigênicos e inibidores de proteases (SILVA & SILVA, 2000; FRANCIS *et al.* 2001; VASCONCELOS & OLIVEIRA, 2004; AMARAL, 2007) que vem a integrar o alimento advindo de diversas fontes

Diversas discussões são realizadas comparando a eficiência dos níveis proteicos e da taxa de eficiência proteica de rações com ingredientes de origem animal e vegetal (Tabela 3). A farinha de peixe utilizada na formulação de rações é considerada o padrão para comparação com outros ingredientes por conter proteína de alta qualidade e componentes que contribuem para saúde e função imune em peixes ósseos (DREW *et al.* 2007). É importante destacar, ainda, que a viabilidade da substituição da farinha de peixe por ingredientes vegetais está condicionada ao hábito alimentar do animal a ser cultivado (SILVA, 2010).

As implicações dos fatores antinutritivos presentes em rações vão além do estado nutricional do animal havendo implicações na saúde de diversos peixes de cultivo especialmente pelos potenciais efeitos negativos, como os observados em peixes alimentados com farelo de soja (DREW *et al.* 2007; CHIKWATI *et al.* 2011).

A exemplo: enterite e outras enteropatias no salmão do atlântico *Salmo salar* L. (KNUDSEN *et al.* 2008; PENN *et al.* 2011; KORTNER *et al.* 2012), diversos danos na mucosa posterior do intestino do salmão *Oncorhynchus tshawytscha* (BUREAU *et al.* 1998), efeitos na morfologia intestinal distal da truta arco-íris *Oncorhynchus mykiss* (YAMAMOTO *et al.* 2012), extensas patologias no trato digestivo do pacu *Piaractus mesopotamicus* e da truta arco-íris *Oncorhynchus mykiss* (OSTASZEWSKA *et al.* 2005), além de efeitos na resposta imune da *Sparus aurata* L. (KOKOU *et al.* 2012). Ainda há carência quando aos efeitos dos diferentes FN's na morfologia e fisiologia intestinal de peixes tropicais, todavia infere-se que há prejuízos pelos estudos realizados com as espécies já citadas.

| | Proteína Bruta (g/Kg) | Taxa de eficiência proteica | Compostos secundários |
|-------------------------|----------------------------------|--|---|
| Farinha de Peixe | 500-720 | 3.1-3.7 | - |
| Farinha de soja | 480 | 1.60 | Inibidores de tripsina, lectinas, fitatos, taninos, compostos fenólicos, fibra. |
| Tremoços | 350 | 2.32 | Saponinas, antígenos, fitoestrógenos |
| Linhaça | 260 | 2.88 | Glicosídeos cianogênicos. |

Tabela 3 - Propriedades nutricionais dos ingredientes utilizados em dietas em aquicultura. (Friedman, 1996; Drew *et al.* 2007)

Dentre os diversos fatores antinutricionais reportados na literatura os competidores irreversíveis de proteases merecem atenção por influenciarem diretamente a digestão e utilização proteica pelos animais de cultivo (GUILLAMÓN *et al.* 2008). A potencia dos inibidores de proteases depende de sua origem e a enzima alvo (FRANCIS *et al.* 2001) e normalmente são classificados em duas famílias: *Kunitz* e *Bowman-Birk* a primeira

família mais sensível a mudanças de temperatura e a mudanças no pH e a segunda é mais estável a estas variações.

Tripsinas e quimotripsinas são os principais alvos dos inibidores de proteases por estarem diretamente ligadas a digestão proteica. A inibição da tripsina frente ao inibidor de soja ocorre de modo a formar um composto estequiométrico irreversível, já a reação entre a quimotripsina e o mesmo inibidor é reversível (KUNITZ, 1946). Entretanto, mesmo com diversos estudos sobre os efeitos de derivados vegetais em rações, ainda há muito a se conhecer sobre as interações moleculares dos FN's (KORTNER *et al.* 2012).

2.5 Referências

ABADIE-GUEDES R.; SANTOS S.D.; CAHÚ T.B.; GUEDES R.C.A.; BEZERRA R.S.; Dose-dependent effects of astaxanthin on cortical spreading depression in chronically ethanol-treated adult rats. **Alcohol Clin Exp Res.** 32, 1417–1421. 2008.

AMARAL, I. P. G. Imobilização de tripsina de tilápia nilótica em Dacron ferromagnético: caracterização do derivado e sua aplicação na detecção de inibidores de protease. Dissertação (Mestrado em Bioquímica). Universidade Federal de Pernambuco, 71p, 2007.

ANON. Global commodity markets—review and price forecast. **The World Bank, Washington, DC**; 2009.

ARVANTOYANNIS, I.S. E KASSAVET, A. Fish industry waste: treatments, environmental impacts, current and potential uses. **International Journal of Food Science and Technology.** 43, 726–745 2008.

AZEVEDO, V. V. C.; CHAVES, S. A.; BEZERRA, D. C.; LIA FOOK, M. V.; COSTA, A. C. F. M. Quitina e Quitosana: aplicações como biomateriais. **Revista Eletrônica de Materiais e Processos.** 2 (3), 27-34. 2007.

BAJPAL, S.; SHARMA, A.; GUPTA, MN.; Removal and recovery of antinutritional factors from soybean flour. **Food Chemistry** 89 497–501 2005.

BEVERIDGE, M.C.M.; BAIRD, D.J. Diet, feeding and digestive physiology. In: BEVERIDGE, M.C.M.; MCANDREW, B.J. (Eds.) *Tilapias: Biology and exploitation.* **Kluwer Academic Pub.**, p. 59-87. 2000.

BEZERRA, R. S., SANTOS, J.F., PAIVA, P.M.G., CORREIA, M.T.S., COELHO, L.C.B.B., VIEIRA, V.L.A. AND CARVALHO JR.,L.B., Partial purification and characterization of a thermostable trypsin from pyloric caeca of tambaqui (*Colossoma macropomum*). **Journal of Food Biochemistry.** 25, 199-210. 2001.

BEZERRA, R.S., LINS, E.J.F., ALENCAR, R.B., et al. Alkaline proteinase from intestine of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). **Process Biochemistry**, v.40, p.1829-1834, 2005.

BLUNT, J. W.; COPP, B. R.; MUNRO, M. H. G.; NORTHCOTE, P. T.; PRINSEP, M. R. Marine natural products. **Natural Products Reports**. 27, 165-237. 2010.

BOLL, M.G., SATO, G., AMARAL JR., H.A. Resultados preliminares de método alternativo de manejo da Tilápia, *Oreochromis niloticus*, no período de inverno em regiões de clima subtropical. In: ENCONTRO RIOGRANDENSE DE TÉCNICOS EM AQUICULTURA, 6, ENCONTRO BRASILEIRO DE AQUICULTURA, 3, 1995, Ibirubá. Anais... Porto Alegre: Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Departamento de Zootecnia, Setor de Aquicultura. p.88-93. 1995.

BOSCOLLO, W. R.; HAYASHI, C.; MEURER, F.; FEIDEN, A.; BOMBARDELLI, R. A. Digestibilidade Aparente da Energia e Proteína das Farinhas de Resíduo da Filetagem da Tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) e da Corvina (*Plagioscion squamosissimus*) e Farinha Integral do Camarão Canela (*Macrobrachium amazonicum*) para a Tilápia do Nilo. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.33, n.1, p.8-13, 2004.

BOSCOLO, W.R.; HAYASHI, C.; SOARES, C.M. et al. Desempenho e características de carcaça de machos revertidos de tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*), linhagens tailandesa e comum, nas fases inicial e de crescimento. **Revista Brasileira de Zootecnia**. 30 (5), 1391-1396. 2001.

BOUVIER, E. L. Crustacés décapodes nouveaux recueillis à Païta (Pérou) par M. le Dr Rivet.— **Bulletin du Muséum national d'Histoire naturelle** (1) 13, 113-116. 1907.

BRASIL, Ministério da Saúde. Organização Pan-Americana da Saúde. Ministério da Ciência e Tecnologia. Caracterização do Estado da Arte em Biotecnologia Marinha do Brasil / Ministério da Saúde, Organização Pan Americana da Saúde, Ministério da Ciência e Tecnologia – Brasília. 134p. 2010.

BUREAU, D. P.; HARRIS, A. M.; CHO, C. Y. The effects of purified alcohol extracts from soy products on feed intake and growth of Chinook salmon (*Oncorhynchus tshawytscha*) and rainbow trout. **Aquaculture**. 161 (1-4), 27-43. 1998.

CAHÚ, T. B.; SANTOS, S. D.; MENDES, A.; CÓRDULA, C. R. CHAVANTE, S. F.; CARVALHO JR, L. B.; NADER, H. B.; BEZERRA, R. S. Recovery of chitin, chitosan, carotenoids and glycosaminoglycans from Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) processing waste. **Process Biochemistry**. 47, 570-577. 2012.

CHIKWATI, E.; VENOLD, FF.; PENN, MH. et al. Interaction of soyasaponins with plant ingredients in diets for Atlantic salmon, *Salmo salar* L. **British Journal of Nutrition** 107, 1570–1590, 2012.

D'INCÃO, F AND REIS, E. G. Community-based management and technical advice in Patos Lagoon estuary (Brazil). **Ocean Coastal Manage.** 45, 531-539. 2002.

DAVIS, D.A.; ARNOLD, C.R. Replacement of fish meal in practical diets for the Pacific white shrimp, *Litopennaeus vannamei*. **Aquaculture**, v. 235, p. 291-298, 2000.

DREW, M.D.; BORGESON, T.L.; THIESSEN, D.L; A review of processing of feed ingredients to enhance diet digestibility in finfish. **Animal Feed Science and Technology** 138 118–136. 2007.

ESPÓSITO, T. S. Aplicação de proteases alcalinas das vísceras do tambaqui (*Colossoma macropomum*) e da carpa (*Cyprinus carpio*) como aditivo de detergentes em pó. Dissertação (Mestrado em Recursos Pesqueiros e Aquicultura) – Universidade Federal Rural de Pernambuco – UFRPE. 97 p. 2006.

ESPÓSITO, T. S.; MARCUSCHI, M.; AMARAL, I. P. G.; CARVALHO JR, L. B.; BEZERRA, R. S. Trypsin from the processing waste and its compatibility with oxidants, surfactants and commercial detergents. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. 58, 6433-6439. 2010.

FAO (Food and Agricultural Organization). The state of the world fisheries and aquaculture. June, 2012.

FERRARO, V.; CRUZ, I. B.; JORGE, R. F.; et al. Valorisation of natural extracts from marine source focused on marine by-products: A review. **Food Research International**. 43, 2221-2233. 2010.

FRANCIS, G.; MAKKAR, H. P. S.; BECKER, K. Antinutritional factors present in plant-derived alternative fish feed ingredients and their effects in fish. **Aquaculture**. 199, 197-227. 2001.

FREITAS JR, A. C. V; COSTA, H. M. S.; ICIMOTO, M. Y.; HIRATA, I. Y.; MARCONDES, M.; CARVALHO JR, L. B.; OLIVEIRA, V.; BEZERRA, R. S. Giant Amazonian Fish pirarucu (*Arapaima gigas*): Its viscera source of thermostable trypsin. **Food Chemistry**. 133, 1596–1602. 2012.

FRIEDMAN, M., 1996. Nutritional value of proteins from different food sources: a review. J. Agric. **Food Chemistry**. 6–29.1996.

FURUYA, W. M.; PEZZATO, L. E.; PEZZATO, A. C.; BARROS, M. M.; MIRANDA, E. C. Coeficientes de digestibilidade e valores de aminoácidos digestíveis de alguns ingredientes para Tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*). **Revista Brasileira de Zootecnia**. 30(4), 1143-1149, 2001.

GONSALVES, A. A.; ARAÚJO, C. R. M.; SOARES, N. A.; GOULART, M. O. F.; ABREU, F. C. Diferentes estratégias para reticulação de quitosana. **Química Nova**. 15 (0), 1-9. 2011.

GUEDES, R. C. A.; ABADIE-GUEDES, R.; BEZERRA, R. S. The use of cortical spreading depression for studying the brains actions of antioxidants. **Nutritional Neuroscience**. 15 (3), 111-119. 2012.

GUERIN, M.; HUNTLEY, M. E.; OLAIZOLA, M. *Haematococcus* astaxanthin: applications for human health and nutrition. **Trends Biotechnology** 21(5):210-216. 2003.

GUILLAMÓN, E.; PEDROSA, M. M.; BURBANO, C.; CUADRADO, C.; SANCHEZ, M. C.; MUZQUIZ, M. The trypsin inhibitors presents in seed of different grain legume species and cultivar. **Food Chemistry**. 107, 68-74. 2008.

GUSMÃO, J; LAZOSKI, C; MONTEIRO, S. A.; SOLÉ-CAVA, A. M. Cryptic species and population structuring of the Atlantic and Pacific seabob shrimp species, *Xiphopenaeus kroyeri* and *Xiphopenaeus riveti*. **Marine Biology**. 149, 491-502. 2006.

HOLANDA, H. D. & NETTO, F. L. Recovery of components from shrimp (*Xiphopenaeus kroyeri*) processing waste by enzymatic hydrolysis. **Food Chemistry and Toxicology**. 71, 298-303. 2006.

ISLAM, M. D. KHAN, S.; TANAKA, M. Waste loading in shrimp and fish processing effluents: potential source of hazards to the coastal and nearshore environments. **Marine Pollution Bulletin**. 49, 103-110. 2004.

JAYACUMAR, R.; PRABAHARAN, M.; KUMAR, P. T. S.; NAIR, S. V.; TAMURA, H. Biomaterials based on chitin and chitosan in wound dressing applications. **Biotechnology Advances**. 29, 322-337. 2011.

KARUNASAGAR, I.; KARANUSAGAR, I. Listeria in tropical fish and fishery products. **International Journal of Food Microbiology**. 62 (3), 177-181. 2000.

KNUDSEN, D.; JUTFELT, F.; SUNDH, H.; SUNDELL, K.; KOPPE, W.; FROKIAER, H. Dietary soya saponins increased gut permeability and play a key role in the onset of soyabean-induced enteritis in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). **British Journal of Nutrition**. 100, 120-129. 2008.

KOKOU, F.; RIGOS, G.; HENRY, M.; KENTOURI, M.; ALEXIS, M. Growth performance, feed utilization and non-specific immune response of gilthead sea bream (*Sparus aurata* L.) fed graded levels of bioprocessed soybean meal. **Aquaculture**. 364-365, 74-81. 2012.

KORTNER, T. M.; SKUGOR, S.; PENN, M. H.; MYDLAND, L. T.; DJORDJEVIC, B.; HILLESTAD, M.; KRASNOV, A.; KROGDAHL, A. Dietary soyasaponin supplementation to pea protein concentrate reveals nutrigenomic interactions underlying enteropathy in Atlantic Salmon (*Salmo salar*). **BMC Veterinary Research**. 8 (101), 1-17. 2012.

KOTZAMANIS, Y. P.; ALEXIS, M. N.; Andriopoulou, A.; Castritsi-Cathariou, I.; Fotis, G. Utilization of waste material resulting from trout processing in gilthead bream (*Sparus aurata* L.) diets. **Aquaculture Research**. 31 (1), 288-295. 2001.

KRAJEWSKA, B. Applications of chitin- and chitosan-based materials for enzyme immobilizations: A review. **Enzyme and Microbial Technology**, 35, 126-139, 2004.

KUMIRSKA, J.; WEINHOLD, M. X.; THOMING, J.; STEPNOWSKI, P. Biomedical activity of chitin/chitosan based materials – Influence of physicochemical properties apart from molecular weight and degree of N-Acetylation. **Polymers**. 3, 1875-1901. 2011.

KUNITZ, M. Crystalline soybean trypsin inhibitor. **The Journal of General Physiology**. 1, 291-310. 1946.

KURTOVIC, I.; MARSHALL, S. N.; ZHAO, X. Hydrophobic immobilization of a bile salt activated lipase from Chinook salmon (*Oncorhynchus tshawytscha*). **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**. 72 (3-4). 168-174, 2011.

LIU, K; LI, X. F.; LI, X.; HE, B.; ZHAO, G. Lowering the cationic demand caused by PGA in papermaking by solute adsorption and immobilized pectinase on chitosan beads. **Carbohydrate Polymers**. 82, 648-652. 2010.

LORENZ, R. T.; CYSEWSKI, G.R. Commercial potential for Haemotococcus microalgae as a natural source of astaxanthin. **Trends in Biotechnology**. 18 (4), 160-167. 2000.

MACARI, S. M. Desenvolvimento de formulação de embutido cozido à base de Tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*). Dissertação de Mestrado em Tecnologia de Alimentos. Programa de Pós-Graduação em Tecnologia de Alimentos, Universidade Federal do Paraná. 122p. 2007.

MAOKA, T. Carotenoids in Marine Animals. **Marine Drugs**. 9, 278-293. 2011.

MOREIRA, K. A., ALBUQUERQUE, B. F., TEIXEIRA, M. F. S. et al.. Application of protease from *Nocardopsis* sp. as a laundry detergent additive. **World Journal of Microbiology & Biotechnology**. 18, 307–312. 2002.

MPA, Brasil. Boletim Estatístico da Pesca e Aquicultura, Brasil – 2010. Ministério da Pesca e Aquicultura. 2012.

NELSON, D. L.; COX, M. M. Lenhinger: Princípios de Bioquímica. 4 ed. São Paulo: Sarvier, 2004. 1119p.

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

OGAWA, M.; MAIA, E. L.; FERNANDES, A. C.; NUNES, M. L.; OLIVEIRA, M. E. B.; FREITAS, S. T. Resíduos do beneficiamento do camarão cultivado: obtenção de pigmentos carotenoides. **Ciência e Tecnologia de Alimentos, Campinas**. 27 (2), 333-337. 2007.

OSTASZEWSKA, T.; DABROWSKI, K.; PALACIOS, M. E.; OLEJNICZAK, M.; WIECZOREK, M. Groth and morphological changes in the digestive tract of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) and pacu (*Piaractus mesopotamicus*) due to casein replacement with soybean proteins. **Aquaculture**. 245 (1-4), 273-286. 2005.

PARK, J. S.; CHYUN, J. H.; KIM, Y. K.; LINE, L.L.; CHEW, B. P. Astaxanthin decreased oxidative stress and inflammation and enhanced immune response in humans. **Nutrition e Metabolism**. 7 (18). 1-10. 2010.

PENN, M. H.; BENDIKSEN, E. A.; CAMPBELL, P.; KROGDAHL, A. High level of dietary pea protein concentrate induces enteropathy in Atlantic Salmon (*Salmo salar* L.). **Aquaculture**. 310 (1-4), 267-273. 2011.

PRADO, A. G. S.; SANTOS, A. L. F.; PEDROSO, C. P.; CARVALHO, T. O.; BRAGA, L. R.; EVANGELISTA, S. M. Vitamin A and Vitamin E interaction behavior on chitosan microspheres: A calorimetric view. **Journal Therm Anal Calorim**. 1, 1-9. 2011.

RAO, M.B., TANKSALE, A.M., GHATGE, M.S. AND DESHPANDE, V.V., Molecular and biotechnological aspects of microbial proteases. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, 62 597-635. 1998.

RICCIONI, G.; D'ORAZIO, N.; FRANCESCHELLI, S.; SPERANZA, L. Marine Carotenoids and Cardiovascular Risk Markers. **Marine Drugs**. 9, 1166-1175. 2011.

SAYED, A. F. M. Total replacement of fish meal with animal protein sources in Nile Tilapia, *Oreochromis niloticus* (L.), feeds. **Aquaculture Research**. 29, 275–280. 1998.

SHI, Y. C.; JIANG, Y. M.; SUI, D. X.; LI, Y.L.; CHEN, T.; LIN, M.; DING, Z. T. Affinity chromatography of trypsin using chitosan as ligand support. **Journal of Chromatography A**. 742, 107-112. 1996.

SILVA, J. F. X. Produção e caracterização de hidrolisado proteico provenientes de resíduos de tilápia (*Oreochromis niloticus*). Dissertação de mestrado em Recursos Pesqueiros e Aquicultura. 75p. 2010.

SILVA, J. F.; ESPÓSITO, T. S.; MARCUSCHI, M.; et al. Purification and partial characterisation of a trypsin from the processing waste of the silver mojarra (*Diapterus rhombeus*). **Food Chemistry**. 129(3), 777-782. 2011.

SILVA, M.R.; SILVA, M.A.A.P. Antinutritional factors: protease inhibitors and lectins. **Revista de Nutrição**, v.13, p.3-9, 2000.

SIMPSON, A. W. E WATLING, L. An investigation of the cumulative impacts of shrimp trawling on mud-bottom fishing grounds in the Gulf Maine: effects on habitat and macrofaunal structure. **ICES Journal of Marine Science**. 63, 1616-1630. 2006.

STOCKHAUSEN, B.; OFFICER, R.A.; SCOTT, R. Discard mitigation – what we can learn from waste minimization practices in other natural resources?. **Marine Policy** 36, 90–95, 2012.

SUGIURA, M.; NAKAMURA, M.; OGAWA, K.; IKOMA, Y.; YANO, M. High Serum Carotenoids Associated with Lower Risk for Bone Loss and Osteoporosis in Post Menopausal Japanese Female Subjects: Prospective Cohort Study. **PLOS ONE**. 7 (12), 1-9. 2012.

TANAKA, T.; SHNIMIZU, M.; MORIWAKI, H. Cancer Chemoprevention by Carotenoids. **Molecules**. 17 (3). 3202-3242. 2012.

VASCONCELOS, I. M.; OLIVEIRA, J. T. A. Antinutritional properties of plant lectins. **Toxicon**, 44, 385-403, 2004.

WU, R. S. S. The environmental impact of Marine Fish Culture: Towards a Sustainable Future. **Marine Pollution Bulletin**. 31, 159-166. 1995.

YUSOF N.L.B.M.; WEE A, LIM L.Y.; KHOR E. Flexible chitin films as potential wound-dressing materials: wound model studies. **J Biomed Mater Res** 66A:224–32. 2003.

REFERÊNCIAS GERAIS

ABADIE-GUEDES R. et al. Dose-dependent effects of astaxanthin on cortical spreading depression in chronically ethanol-treated adult rats. **Alcohol Clin Exp Res.** 32, 1417–1421. 2008.

AMARAL, I.P.G. **Imobilização de tripsina de tilápia nilótica em Dacron ferromagnético: caracterização do derivado e sua aplicação na detecção de inibidores de protease.** 2007. 71f. Dissertação (Mestrado em Bioquímica). Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2007.

AMARAL, I.P.G. et al. Fish trypsin immobilized on ferromagnetic Dacron. **Process Biochemistry**, 2006. 41(5): p. 1213-1216.

ANON. Global commodity markets—review and price forecast. **The World Bank, Washington, DC;** 2009.

ARVANITTOYANNIS, I.S. E KASSAVET, A. Fish industry waste: treatments, environmental impacts, current and potential uses. **International Journal of Food Science and Technology.** 43, 726–745 2008.

AZEVEDO, V. V. C. et al. Quitina e Quitosana: aplicações como biomateriais. **Revista Eletrônica de Materiais e Processos.** 2 (3), 27-34. 2007.

BAJPAI, S.; SHARMA, A.; GUPTA, M.N.; Removal and recovery of antinutritional factors from soybean flour. **Food Chemistry.** 89 497–501 2005.

BEVERIDGE, M.C.M.; BAIRD, D.J. Diet, feeding and digestive physiology. In: beveridge, m.c.m.; mcandrew, b.j. (Eds.) Tilapias: Biology and exploitation. **Kluwer Academic Pub.**, p. 59-87. 2000.

BEZERRA, R. S. et al. Partial purification and characterization of a thermostable trypsin from pyloric caeca of tambaqui (*Colossoma macropomum*). **Journal of Food Biochemistry.** 25, 199-210. 2001.

BEZERRA, R.S. et al. Alkaline proteinase from intestine of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). **Process Biochemistry**, v.40, p.1829-1834, 2005.

BLUNT, J. W. et al. Marine natural products. **Natural Products Reports.** 27, 165-237. 2010.

BOLL, M.G., SATO, G., AMARAL JR., H.A. Resultados preliminares de método alternativo de manejo da Tilápia, *Oreochromis niloticus*, no período de inverno em regiões de clima subtropical. In: ENCONTRO RIOGRANDENSE DE TÉCNICOS EM AQUICULTURA, 6, ENCONTRO BRASILEIRO DE AQUICULTURA, 3, 1995. Ibirubá. **Anais**. Porto Alegre: Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Departamento de Zootecnia, Setor de Aquicultura. p.88-93. 1995.

BOSCOLLO, W. R. et al. Digestibilidade Aparente da Energia e Proteína das Farinhas de Resíduo da Filetagem da Tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) e da Corvina (*Plagioscion squamosissimus*) e Farinha Integral do Camarão Canela (*Macrobrachium amazonicum*) para a Tilápia do Nilo. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.33, n.1, p.8-13, 2004.

BOSCOLO, W.R.; HAYASHI, C.; SOARES, C.M. et al. Desempenho e características de carcaça de machos revertidos de tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*), linhagens tailandesa e comum, nas fases inicial e de crescimento. **Revista Brasileira de Zootecnia**. 30 (5), 1391-1396. 2001.

BOUVIER, E. L. Crustacés décapodes nouveaux recueillis à Païta (Pérou) par M. le Dr Rivet.— **Bulletin du Muséum national d’Histoire naturelle** (1) 13, 113-116. 1907.

BRASIL, Ministério da Saúde. Organização Pan-Americana da Saúde. Ministério da Ciência e Tecnologia. **Caracterização do Estado da Arte em Biotecnologia Marinha do Brasil** / Ministério da Saúde, Organização Pan Americana da Saúde, Ministério da Ciência e Tecnologia – Brasília. 134p. 2010.

BUREAU, D. P.; HARRIS, A. M.; CHO, C. Y. The effects of purified alcohol extracts from soy products on feed intake and growth of Chinook salmon (*Oncorhynchus tshawytscha*) and rainbow trout. **Aquaculture**. 161 (1-4), 27-43. 1998.

CAHÚ, T. B. et al. Recovery of chitin, chitosan, carotenoids and glycosaminoglycans from Pacific white shrimp (*Litopennaeus vannamei*) processing waste. **Process Biochemistry**. 47, 570-577. 2012.

CHIKWATI, E. et al. Interaction of soyasaponins with plant ingredients in diets for Atlantic salmon, *Salmo salar* L. **British Journal of Nutrition** 107, 1570–1590, 2012.

D’INCÃO, F AND-REIS, E. G. Community-based management and technical advice in Patos Lagoon estuary (Brazil). **Ocean Coastal Manage**. 45, 531-539. 2002.

DAVIS, D.A.; ARNOLD, C.R. Replacement of fish meal in practical diets for the Pacific white shrimp, *Litopennaeus vannamei*. **Aquaculture**, v. 235, p. 291-298, 2000.

DENG, Y.H., et al., Synthesis of Core/Shell Colloidal Magnetic Zeolite Microspheres for the Immobilization of Trypsin. **Advanced Materials**. 21(13): p. 1377-1382. 2009.

DREW, M.D.; BORGESON, T.L.; THIESSEN, D.L; A review of processing of feed ingredients to enhance diet digestibility in finfish. **Animal Feed Science and Technology** 138 118–136. 2007.

ESPÓSITO, T. S. **Aplicação de proteases alcalinas das vísceras do tambaqui (*Colossoma macropomum*) e da carpa (*Cyprinus carpio*) como aditivo de detergentes em pó**. 2006. 97 f. Dissertação (Mestrado em Recursos Pesqueiros e Aquicultura) – Universidade Federal Rural de Pernambuco, 2006.

ESPOSITO, T.S., et al., Fish processing waste as a source of alkaline proteases for laundry detergent. **Food Chemistry**, 112(1): p. 125-130. 2009.

ESPOSITO, T.S., et al., Surfactants- and oxidants-resistant alkaline proteases from common carp (*Cyprinus carpio L.*) processing waste. **Journal of Food Biochemistry**, 33(6): p. 821-834. 2009.

Esposito, T.S., et al., Trypsin from the Processing Waste of the Lane Snapper (*Lutjanus synagris*) and Its Compatibility with Oxidants, Surfactants and Commercial Detergents. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 58(10): p. 6433-6439. 2010.

FAO (Food and Agricultural Organization). **The state of the world fisheries and aquaculture**. June, 2012.

FERRARO, V. et al. Valorisation of natural extracts from marine source focused on marine by-products: A review. **Food Research International**. 43, 2221-2233. 2010.

FRANCIS, G.; MAKKAR, H. P. S.; BECKER, K. Antinutritional factors present in plant-derived alternative fish feed ingredients and their effects in fish. **Aquaculture**. 199, 197-227. 2001.

FREITAS JR, A. C. V. et al. Giant Amazonian Fish pirarucu (*Arapaima gigas*): Its viscera source of thermostable trypsin. **Food Chemistry**. 133, 1596–1602. 2012.

FRIEDMAN, M. Nutritional value of proteins from different food sources: a review. **J. Agric. Food Chemistry**. 6–29.1996.

FURUYA, W. M. et al.. Coeficientes de digestibilidade e valores de aminoácidos digestíveis de alguns ingredientes para Tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*). **Revista Brasileira de Zootecnia**. 30(4), 1143-1149, 2001.

- GONSALVES, A. A. et al. Diferentes estratégias para reticulação de quitosana. **Quimica Nova**. 15 (0), 1-9. 2011.
- GUEDES, R. C. A.; ABADIE-GUEDES, R.; BEZERRA, R. S. The use of cortical spreading depression for studying the brains actions of antioxidants. **Nutrional Neuroscience**. 15 (3), 111-119. 2012.
- GUERIN, M.; HUNTLEY, M. E.; OLAIZOLA, M. *Haematococcus* astaxanthin: applications for human health and nutrition. **Trends Biotechnology** 21(5):210-216. 2003.
- GUILLAMÓN, E. et al. The trypsin inhibitors presents in seed of different grain legume species and cultivar. **Food Chemistry**. 107, 68-74. 2008.
- GUSMÃO, J. et al. Cryptic species and population structuring of the Atlantic and Pacific seabob shrimp species, *Xiphopenaeus kroyeri* and *Xiphopenaeus riveti*. **Marine Biology**. 149, 491-502. 2006.
- HOLANDA, H. D. & NETTO, F. L. Recovery of components from shrimp (*Xiphopenaeus kroyeri*) processing waste by enzymatic hydrolysis. **Food Chemistry and Toxicology**. 71, 298-303. 2006.
- ISLAM, M. D. KHAN, S.; TANAKA, M. Waste loading in shrimp and fish processing effluents: potential source of hazards to the coastal and nearshore environments. **Marine Pollution Bulletin**. 49, 103-110. 2004.
- ISOBE, N., et al., Immobilization of protein on cellulose hydrogel. **Cellulose**, 18(5): p. 1251-1256. 2011.
- JAYACUMAR, R. et al. Biomaterials based on chitin and chitosan in wound dressing applications. **Biotechnology Advances**. 29, 322-337. 2011.
- KARUNASAGAR, I.; KARANUSAGAR, I. Listeria in tropical fish and fishery products. **International Journal of Food Microbiology**. 62 (3), 177-181. 2000.
- KLOMKLAO, S., et al., Purification and characterization of trypsin from the spleen of tongol tuna (*Thunnus tonggol*). **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 54(15): p. 5617-5622. 2006.
- KNUDSEN, D. et al. Dietary soya saponinas increased gut permeability and play a key role in the onset of soyabean-induced enteritis in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). **British Journal of Nutrition**. 100, 120-129. 2008.

KOKOU, F. et al. Growth performance, feed utilization na non-specific immune response of gilthead sea bream (*Sparus aurata L.*) fed graded levels of bioprocessed soybean meal. **Aquaculture**. 364-365, 74-81. 2012.

KORTNER, T. M. et al. Dietary soyasaponin supplementation to pea protein concentrate reveals nutrigenomic interactions underlying enteropathy in Atlantic Salmon (*Salmo salar*). **BMC Veterinary Research**. 8 (101), 1-17. 2012.

KOTZAMANIS, Y. P.; ALEXIS, M. N.; Andriopoulou, A.; Castritsi-Cathariou, I.; Fotis, G. Utilization of waste material resulting from trout processing in gilthead bream (*Sparus aurata L.*) diets. **Aquaculture Research**. 31 (1), 288-295. 2001.

KRAJEWSKA, B. Applications of chitin- and chitosan-based materials for enzyme immobilizations: A review. **Enzyme and Microbial Technology**, 35, 126-139, 2004.

KUMIRSKA, J. et al. Biomedical activity of chitin/chitosan based materials – Influence of physicochemical properties apart from molecular weight and degree of N-Acetylation. **Polymers**. 3, 1875-1901. 2011.

KUNITZ, M. Crystalline soyben trypsin inhibitor. **The Journal of General Physiology**. 1, 291-310. 1946.

KURTOVIC, I.; MARSHALL, S. N.; ZHAO, X. Hydrophobic immobilization of a bile salt activated lipase from Chinook salmon (*Oncorhynchus tshawytscha*). **Journal of Molecular Catalisys B: Enzymatic**. 72 (3-4). 168-174, 2011.

Laemmli, U.K. Cleavage of structural proteins during assembly of head of bacteriophage-T4. **Nature**, 227(5259): p. 680-&. 1970.

LIU, K; LI, X. F.; LI, X.; HE, B.; ZHAO, G. Lowering the cationic demand caused by PGA in papermaking by solute adsorption and immobilized pectinase on chitosan beads. **Carbohydrate Polymers**. 82, 648-652. 2010.

LORENZ, R. T.; CYSEWSKI, G.R. Commercial potential for Haemotococcus microalgae as a natural source of astaxanthin. **Trends in Biotechnology**.18 (4), 160-167. 2000.

MACARI, S. M. **Desenvolvimento de formulação de embutido cozido à base de Tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*)**. 2007. 122f. Dissertação de Mestrado em Tecnologia de Alimentos. Programa de Pós-Graduação em Tecnologia de Alimentos, Universidade Federal do Paraná. 2007.

MACIEL, J.C., et al., Preparation and characterization of magnetic levan particles as matrix for trypsin immobilization. **Journal of Magnetism and Magnetic Materials**, 324(7): p. 1312-1316. 2012.

MAOKA, T. Carotenoids in Marine Animals. **Marine Drugs**. 9, 278-293. 2011.

MARCUSCHI, M., et al., Purification, characterization and substrate specificity of a trypsin from the Amazonian fish tambaqui (*Colossoma macropomum*). **Biochemical and Biophysical Research Communications**, 396(3): p. 667-673. 2010.

MOREIRA, K. A. et al.. Application of protease from *Nocardopsis* sp. as a laundry detergent additive. **World Journal of Microbiology & Biotechnology**. 18, 307–312. 2002.

MPA, Brasil. **Boletim Estatístico da Pesca e Aquicultura**, Brasil – 2010. Ministério da Pesca e Aquicultura. 2012.

NELSON, D. L.; COX, M. M. Lenhinger: **Princípios de Bioquímica**. 4 ed. São Paulo: Sarvier, 2004. 1119p.

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

OGAWA, M. et al. Resíduos do beneficiamento do camarão cultivado: obtenção de pigmentos carotenoides. **Ciência e Tecnologia de Alimentos, Campinas**. 27 (2), 333-337. 2007.

OSTASZEWSKA, T. et al. Groth and morphological changes in the digestive tract of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) and pacu (*Piaractus mesopotamicus*) due to casein replacement with soybean proteins. **Aquaculture**. 245 (1-4), 273-286. 2005.

PARK, J. S. et al. Astaxanthin decreased oxidative stress and inflammation and enhanced immune response in humans. **Nutrition e Metabolism**. 7 (18). 1-10. 2010.

PENN, M. H.; BENDIKSEN, E. A.; CAMPBELL, P.; KROGDAHL, A. High level of dietary pea protein concentrate induces enteropathy in Atlantic Salmon (*Salmo salar* L.). **Aquaculture**. 310 (1-4), 267-273. 2011.

PRADO, A. G. S. et al. Vitamin A and Vitamin E interaction behavior on chitosan microspheres: A calorimetric view. **Journal Therm Anal Calorim**. 1, 1-9. 2011.

RAO, M.B. et al. Molecular and biotechnological aspects of microbial proteases. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, 62 597-635. 1998.

RICCIONI, G. et al. Marine Carotenoids and Cardiovascular Risk Markers. **Marine Drugs**. 9, 1166-1175. 2011.

SAYED, A. F. M. Total replacement of fish meal with animal protein sources in Nile Tilapia, *Oreochromis niloticus* (L.), feeds. **Aquaculture Research**. 29, 275–280. 1998.

SEO, D.J., et al., Immobilization of chitinases from *Streptomyces griseus* and *Paenibacillus illinoisensis* on chitosan beads. **Carbohydrate Polymers**, 88(1): p. 391-394. 2012.

SHI, Y. C. et al. Affinity chromatography of trypsin using chitosan as ligand support. **Journal of Chromatography A**. 742, 107-112. 1996.

SILVA, J. F. X. **Produção e caracterização de hidrolisado proteico provenientes de resíduos de tilápia (*Oreochromis niloticus*)**. 2010. 75f. Dissertação de mestrado em Recursos Pesqueiros e Aquicultura. Recife. 2010.

SILVA, J. F. et al. Purification and partial characterisation of a trypsin from the processing waste of the silver mojarra (*Diapterus rhombeus*). **Food Chemistry**. 129(3), 777-782. 2011.

SILVA, M.R.; SILVA, M.A.A.P. Antinutritional factors: protease inhibitors and lectins. **Revista de Nutrição**, v.13, p.3-9, 2000.

SIMPSON, A. W. E WATLING, L. An investigation of the cumulative impacts of shrimp trawling on mud-bottom fishing grounds in the Gulf Maine: effects on habitat and macrofaunal structure. **ICES Journal of Marine Science**. 63, 1616-1630. 2006.

SINGH, A.N. et al., Glutaraldehyde-Activated Chitosan Matrix for Immobilization of a Novel Cysteine Protease, Procerain B. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 59(11): p. 6256-6262. 2011.

STOCKHAUSEN, B., R.A. OFFICER, AND SCOTT, R. Discard mitigation - what we can learn from waste minimization practices in other natural resources? **Marine Policy**, 36(1): p. 90-95. 2012.

SUGIURA, M.; NAKAMURA, M.; OGAWA, K.; IKOMA, Y.; YANO, M. High Serum Carotenoids Associated with Lower Risk for Bone Loss and Osteoporosis in Post Menopausal Japanese Female Subjects: Prospective Cohort Study. **PLOS ONE**. 7 (12), 1-9. 2012.

TANAKA, T.; SHNIMIZU, M.; MORIWAKI, H. Cancer Chemoprevention by Carotenoids. **Molecules**. 17 (3). 3202-3242. 2012.

UNAJAK, S., et al., Characterisation of thermostable trypsin and determination of trypsin isozymes from intestine of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus* L.). **Food Chemistry**, 134(3): p. 1533-1541. 2012.

VASCONCELOS, I. M.; OLIVEIRA, J. T. A. Antinutritional properties of plant lectins. **Toxicon**, 44, 385-403, 2004.

WANG, Q. et al., Purification and Characterization of Trypsin from the Intestine of Hybrid Tilapia (*Oreochromis niloticus* x *O.aureus*). **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 58(1): p. 655-659. 2010.

WESKA, R.F. et al. Optimization of deacetylation in the production of chitosan from shrimp wastes: Use of response surface methodology. **Journal of Food Engineering**, 80(3): p. 749-753. 2007.

WU, R. S. S. The environmental impact of Marine Fish Culture: Towards a Sustainable Future. **Marine Pollution Bulletin**. 31, 159-166. 1995.

XU, H., et al., Preparation of hydrophilic magnetic nanospheres with high saturation magnetization. **Journal of Magnetism and Magnetic Materials**, 311(1): p. 125-130. 2007.

YUSOF N.L.B.M. et al. Flexible chitin films as potential wound-dressing materials: wound model studies. **J Biomed Mater Res** 66 :224–32. 2003.

ANEXOS

ARTIGO

Application of chitosan-magnetic obtained from *Xiphopenaeus kroyeri* to detect antinutritional factors in diets to fish.

Application of chitosan-magnetic obtained from *Xiphopenaeus kroyeri* detection of antinutritional factors in diets for fish

Rafael Azevedo ^{1,2}, Ian Amaral ², Thiago Cahú ², Ranilson Bezerra ² and Talita Espósito ^{1,2*}

¹ Federal University of Alagoas – Laboratory of New Products, Av. Beira Rio S/N, Penedo-AL - Brazil; E-Mails: rafaeldavidbio@gmail.com (R.A.) talitaesposito@yahoo.com.br (T.E.)

² Federal University of Pernambuco - LABENZ, Cidade Universitária, Recife-PE - Brazil; E-Mails: ianamaral@yahoo.com.br (I.A.); thiagocahu@yahoo.com.br (T.C.); ransoube@uol.com.br (R.B.);

* Author to whom correspondence should be addressed; E-Mail: talitaesposito@yahoo.com.br (T.E.)
Tel.: 055-82-3551-2784.

Received: / Accepted: / Published:

Abstract: The search for bioactive molecules with unique properties constitutes one of the largest endeavors in biotechnology. Recovery of biomolecules from processing waste aquatic organisms represents an excellent opportunity. Chitosan is a polymer obtained from chitin subject to various applications due to their reactive sites. Bioprocesses with magnetic materials represent good solution for many biotechnological processes. Chitosan was recovered from *X. kroyeri* and was magnetized and applied as a support for immobilization of fish proteases from *Oreochromis niloticus*. The intestine was dissected out fresh specimens homogenized in phosphate buffer 0.05M pH 7.8 (1g tissue: 25mL of buffer) and used protease purification. A partially purified trypsin with apparent molecular weight of ~23kDa was obtained after ammonium sulphate precipitation and affinity chromatography. Optimum time of immobilization of trypsin was 8 hours. The best of catalytic activity (1.101 ± 0.0371 m μ /mg) were recorded at a temperature of

50°C. Whereas variations in pH results show higher activity (0.5503 ± 0.0107 m μ /mg) at pH 8.0 phosphate buffer for proteases recovery. Tests storage time of immobilized proteases show that until 60 days the activity is best there is an ideal use of zero to 60 days, however there is still good activity after this period. It is possible to admit that there are good signs for use in bioprocesses protease immobilized on chitosan-magnetic.

Keywords: Chitosan-magnetic; Immobilization; Fish proteases; *Xiphopenaeus kroyeri*.

1. Introduction

The chitosan is polyelectrolyte, derivate of chitin, extremely resembling cellulose by presence of units 2-acetamido-2-deoxy- β -d-glucose. Certain point to the searches with chitosan is the possibility of recovery this polymer from them processing waste of many crustaceans specially crabs, lobster and shrimps. Permitting make good use of byproducts as constitute environmental problem of waste minimization what impetrating require mainly due to the increased production of the last decade and there are signs of continued growth [1-3]. These features encourage the search for the current use of marine by-products and current applications include industries of detergents, animal feed, biodiesel, food and cosmetics [2, 4].

The immobilized enzyme is a process by which biomolecules are chemically or physically linked to supports soluble or insoluble in aqueous medium, in order to obtain derivatives with properties that facilitate its application. All procedures for immobilizing enzymes report a series of vantages when compared with free enzyme. We highlight the possibilities for reuse, efficiency in the liberation of products and greater stability to pH and temperature variations. In this context the use of natural polymers has been used extensively because of the high biocompatibility [5]. Due yours sites reactivas, the chitosan, is susceptible many applications

has processes of immobilized proteins and enzymes having signaling chitosan as ideal matrix for immobilization of enzymes [6-8].

Researches involving various applications of proteases are justified because they are the most important group of commercial enzymes [9] where the physical property hydrolytic are overexploited in the food, detergent, pharmaceutical and leather industries [8]. Adsorbs here to search for alternatives to commercial proteases due to greater economic viability and relative ease of recovery of these biomolecules. In addition to obtain enzymes with interesting properties and thermal resistance and pH variations [10-14]. Magnetic particles can be planned as other matrix for immobilization of biomolecules in various division processes in biotechnology [15]. Is added advantages of easy enzyme recovery of immobilized. Additionally many efforts are being used towards a more efficient handling and introduce additional functionalities to magnetic supports [16].

Among the applications of biotechnology in immobilized proteases for the possibility of their use for detection of anti-nutritional factors (AN's) present in fish feeds such as protease inhibitors, lectins, phytates and tannins [17] and are classified into factors that influence the use and protein digestion, factors influence the use mineral, substances mixed and antivitaminas [18] These compounds have been incorporated into dietary components to fish because the search for alternative dietary protein sources to supplement and replace limited marine ingredients in fish feeds something important for the future of the fish farming industry [19].The effects in animal farming these AN's are varied ranging from the accumulation of visceral fat even serious morphological and physiological [19, 20, 21, 22].

The present work describes the behavior of the purified proteases intestine *Oreochromis niloticus* immobilized on magnetic particles for chitosan recovery of *Xiphopenaeus kroyeri* and their application in the detection of protease inhibitors in diets for fish.

2. Results and Discussion

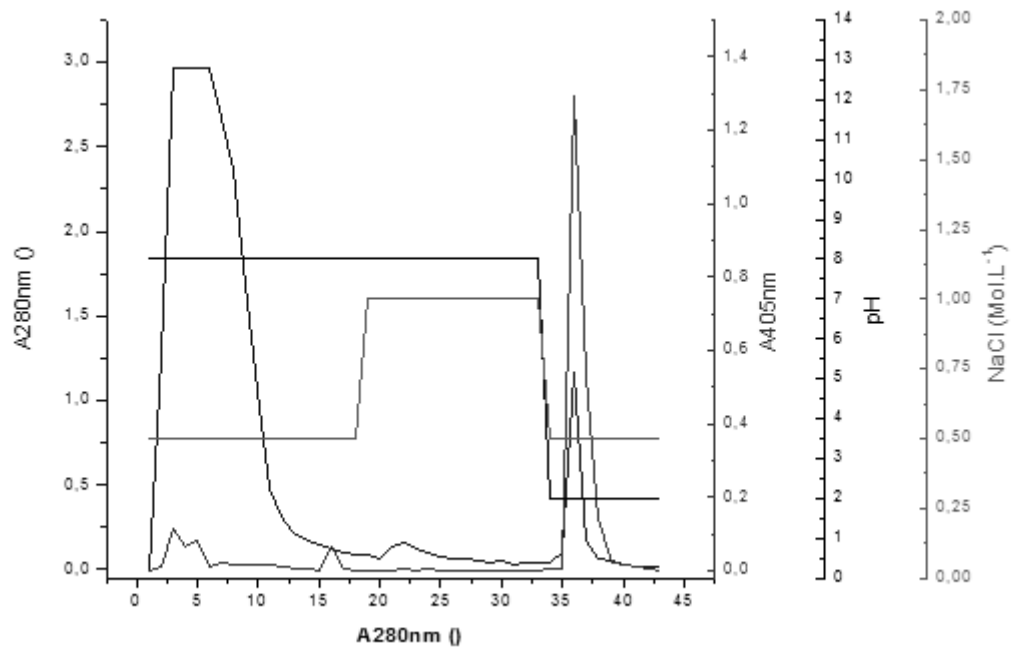
2.1 Enzyme extraction and partial purification

All activities of purification to show workability steps of fraction serine proteases recovery processing waste (Table 1). Especially observing what the recovery fits in previous studies enhancing the viability of these studies, mainly by obtaining biomolecules with peculiarity properties [10, 12, 17]. In addition to the present results show that optimization of purification processes to reduce time and costs of the process. Figure 1 displays the quality of chromatography affinity with benzamidine, accomplished in about one hour, in response to signals as the previous method of effective applications [11] and shows what its use as a single method for purification of proteases. Reinforces the good situation to commercial use of fish processing waste as a source of proteases. After all the costs and time used in the process can now be minimized.

Table 1. Purification serine proteases processing waste the intestine of *Oreochromis niloticus* with ammonium sulfate.

| Fraction | Ptn (mg/mL) | Proteolytic activity (BApNA) | Total Protein (mg) | Total Activity | Especific activity (U/mg) | Purification | Yield (%) |
|----------------------------|-------------|------------------------------|--------------------|----------------|---------------------------|--------------|-----------|
| Crude Extract | 4.673 | 0.018 | 766.37 | 3.007 | 0.0039 | 1.00 | 100% |
| Heat Treatment | 4.467 | 0.031 | 665.51 | 4.619 | 0.0069 | 1.77 | 154% |
| Step ₁ (0-30%) | 10.573 | 0.022 | 158.60 | 0.335 | 0.0021 | 0.54 | 11% |
| Step ₂ (30-70%) | 42.400 | 0.237 | 636.00 | 3.560 | 0.0056 | 1.43 | 118% |
| SF | 1.128 | 0.003 | 186.09 | 0.550 | 0.0030 | 0.75 | 18% |
| Pool | 0.219 | 1.083 | 5.70 | 28.158 | 4.9366 | 1258.30 | 937% |

Figure 1. Chromatogram affinity with benzamidine (applied 5mL sample).



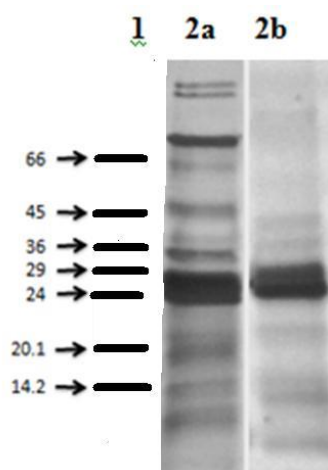
Greater catalytic activity was observed in Step 2 (30-70% of salt saturation) of the purification of proteases. In accordance with many previous studies [11, 12, 18-20] which signals for possible establishment of proteases that the fish are precipitated mostly using concentrations above 30-70% ammonium sulfate. The highest activity for the fractionation was of $0.365 \pm 0.0052 \mu\text{g/mL}$ compared to values below $0.159 \pm 0.0046 \mu\text{g/mL}$ observed for all other stages of the precipitation process.

2.2 Electrophoresis

The purification steps undertaken by electrophoresis are shown in Figure 2. Visually it is possible to observe the success of the purification process by identifying a single band at the end of the process. Analysis of the composition in pixels electrophoresis also shows peaks with more force. At the end of the process view is a single peak which is directly related to the single band identified by electrophoresis. Light discrepancies are observed when

comparing these data with purified trypsin from other aquatic organisms such as *Lutjanus synagris*, *Thunnus tonggol* and *Arapaima gigas* [11, 12, 19] which has a molecular weight of 28.4 kDa, 24.0 kDa and 28.0 kDa, respectively, compared to 23 kDa obtained in this study. Considering only the specie used (*O. niloticus*) is already possible to identify some also consonance with previous studies [13, 14, 18]. The identification of these similarities permits the inference of a certain standard for the agency considered and this aspect is critical to bioprocesses where it is necessary to estimate the molecular weight of proteases purified before their use in biotechnology.

Figure 2. Profile electrophoresis (1) Pattern weight molecular in kDa (2) Steps of purification: (2a) Homogenized Extract; (2b) Enzyme partial purified.

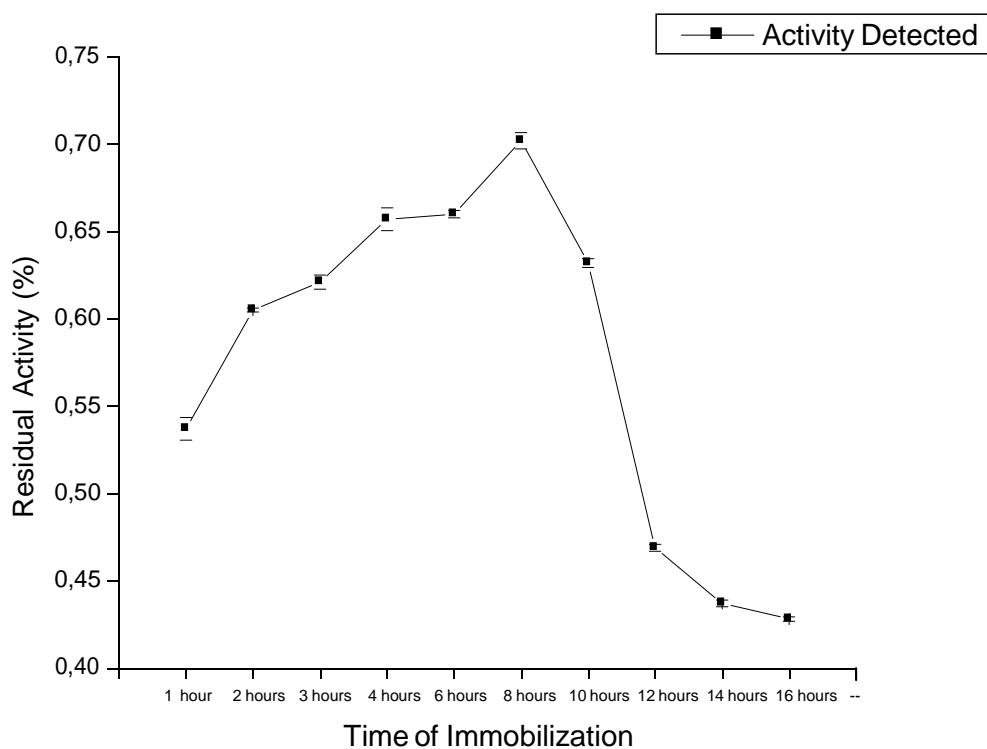


2.3 Trypsin-like immobilization

The amount of enzyme immobilized on the support commercial varied with the time of contact between the protein and chitosan-magnetic support (Figure 3). However, after the second washing at all times there is no effective identification of proteases. Evaluating the time of contact between the enzyme and support chitosan-magnetic by measurement of the

enzyme catalytic activity with BApNA was observed that the time of 8 hours is ideal. Having considerable loss in activity after this time. Probably due to steric processes that prevent the catalytic activity of the immobilized enzyme by saturating the support [21] and probable deformation of reactive sites.

Figure 3. Residual activity of the immobilization process conducted at different times Proteases (A).



2.4 Effects of temperature, pH and storage time

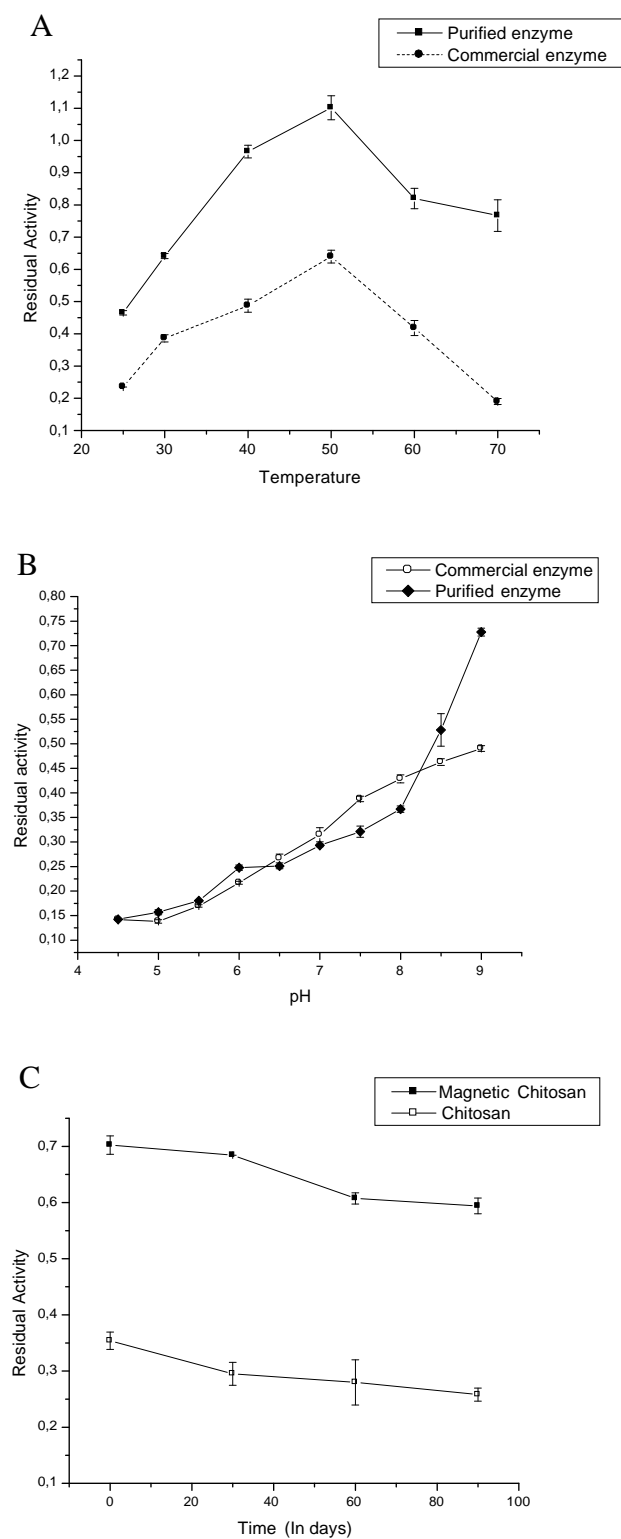
The Figure 4 sintering the results obtained for these parameters. The maximum catalytic activity was observed around 50°C for commercial trypsin and the purified proteases 1.101 ± 0.0371 $\mu\text{g}/\text{mg}$. Being in line with the results observed by Amaral et al. 2006 [22] for

catalytic activity and temperature. These issues point to the possible establishment of a standard proteases of *O. niloticus* immobilizes with respect to temperature. The variations in pH the results show is different from those already observed in previous studies [22] where we see a continuity in the activity even with such variations. Increased activity occurred at pH 9.0 (0.678 ± 0.0219 m μ /mg) for commercial enzyme and 8.0 (0.5503 ± 0.0107 m μ /mg) to purified proteases.

As noted in Figure 4 there is a reduction in catalytic activity over the day in which the enzymes were related to the magnetic support. Possibly this is due to the conformation of the molecule with the support and not by loss of ability to catalyze. After [8, 15] have shown that the reactive site keeps feasible to over 10 reuses. Maciel *et al.* (2012) [15] particles using levan as a support for immobilization of trypsin conditions found a mean activity of $84.43 \pm 5.42\%$ in 10 reuses.

In parallel with the time of immobilization performed no observe a considerable contrast to the conditions observed which time mean activity of $85.18 \pm 0.10\%$ with magnetic-chitosan in 60 days immobilized. This suggests that both carriers offer similar terms to proteases even in different processes of activation of the support. There is also the possibility that this higher activity is related to larger molecular mass (2.624 *mw*) of chitosan-magnetic compared the molecular weight of chitosan non-magnetic (2.292 *mw*). Different conditions can be observed with the study by Singh *et al.* 2011 [8] which had a considerable increase in catalytic activity, of about 15 to 55% with the reuses. It is worth noting that the supports activated with the same solutions (present study and Singh *et al.* 2011 [8]) present contrasting results while there is line with Maciel *et al.* 2012 [15] even compared with reuse store time.

Figure 4. Effects on the variation of temperature with commercial enzyme (A); Variation in pH's (B); Residual activity of storage time immobilized enzyme. (C)



2.6 Detection of inhibitors to the commercial feed

The inhibition of the catalytic activity for immobilized proteases was higher with the feed for fish 7 for commercial enzyme containing a higher amount ingredient fish meal. The residual activity (%) of inhibition of free and immobilized proteases are shown in Table 2.

| Diet | Immobilized Enzyme | | | | Free Enzyme | | | |
|--------|--------------------|--------------------|-----------------|--------------------|-------------------|--------------------|-----------------|--------------------|
| | Commercial Enzyme | | Purified enzyme | | Commercial enzyme | | Purified enzyme | |
| | Average | Standard Deviation | Average | Standard Deviation | Average | Standard Deviation | Average | Standard Deviation |
| Diet 1 | 100 | 0 | 100 | 0 | 100.00 | 0 | 100.00 | 0 |
| Diet 2 | 0.52 | 0.02 | 0.308 | 0.01 | 59.4 | 5.0 | 33.6 | 26.6 |
| Diet 3 | 0.64 | 0.01 | 0.451 | 0.01 | 53.4 | 6.7 | 48.0 | 8.0 |
| Diet 4 | 0.70 | 0.02 | 0.518 | 0.02 | 43.7 | 2.9 | 28.3 | 12.1 |
| Diet 5 | 0.52 | 0.03 | 0.224 | 0.00 | 50.1 | 9.4 | 38.8 | 5.4 |
| Diet 6 | 0.62 | 0.03 | 0.300 | 0.05 | 56.6 | 11.8 | 34.6 | 10.9 |
| Diet 7 | 0.26 | 0.03 | 0.270 | 0.01 | 44.4 | 7.1 | 41.9 | 5.0 |
| Diet 8 | 0.71 | 0.10 | 0.510 | 0.02 | 77.1 | 25.9 | 57.0 | 26.7 |

Table 2. Results of catalytic activity for immobilized and free proteases

3. Experimental Section

3.1 Raw Material

Processing waste of seabob shrimp (head, tails and shells) were collected by the fishing community of Alagoas State and sent to the laboratory of New Products of Federal University of Alagoas. The samples were screened manually for removal of waste no interest. Processing waste of fisheries (*Oreochromis niloticus*) obtained from Noronha Pescados Company Pernambuco State – Brazil. Both samples were transported under refrigeration to the LABENZ – Federal University of Pernambuco. The reagents utilized were acquired with Merck (Darmstad, Germany) and Sigma (St. Louis, MO, USA).

3.2 Recovery of Chitosan

Using the processing waste 0.5 kg of *X. kroyeri* was homogenized with water distilled (w/v) in processor of foods followed by enzymatic autolysis a 40°C in bath of 3 hours. Enzyme present were inactivated at 100°C and oven-dried. The product of homogenization went through stages of decalcification, deproteinization, removal of pigments and desacetylation [23]. The process of desacetylation was carried out by precipitation with 500 mL of NaOH 50% (w/v⁻¹) at 65 °C for 24 h twice. The pH of chitosan was neutralized washed with water, dried at 50°C. In order to obtain a chitosan with high degree of desacetylation the methodology adapted of Weska *et al.* 2007 [24] was applied. The samples de chitosan recovery was lyophilized and used for magnetization.

3.3 Magnetization Chitosan

The magnetization was carried out with FeCl₂ and FeCl₃ 0.6 and 1.1 M, respectively. The chitosan (1g) were solubilized in acetic acid 3% under agitation. FeCl₂ and FeCl₃ solution were added (1:1) and pH was adjusted to 11 with NaOH 0,1M [22]. The compost was to place

in homogenized in bath for 30 min in 80°C. The chitosan-magnetic were collected by magnet and applied washes till as around 7.0 pH. The samples were centrifuged per 20 min at 8,000xg follow by lyophilization.

3.4 Enzyme extraction and partial purification

The proportion of 1:25 g of tissue from *O. niloticus* were homogenized in phosphate buffer 0.05M pH7.8 using tissue homogenizer. The product obtained was centrifuged at 10,000xg for 10 min at 4°C and precipitated (nuclei and dell debris) to discard. The crude extract was applied the 45°C by 30 min and immediate refrigerated. Fraction was carried in two steps with ammonium sulfate 0-30% (Step S₁) and 30-70% (Step S₂). The extract was applied ice bath and ammonium sulfate was add slowly followed by incubation overnight at 4°C. After every step was centrifuged at 10,000 g at 4°C for 10 min and the precipitated recovery to two steps (S₁, S₂) with 10 mL of phosphate buffer 0.05M pH 7.8.

The result of steps purification was applied in the affinity chromatography HiTrap Benzamidine FF (GE Healthcare™). Washes of column was performed with 10mL of tris-HCl buffer 0.01M pH + 1M NaCl. 5mL of ammonium sulphate step fraction was applied followed by washes with tris-HCl buffer 0.01M pH + 1M NaCl till abs 280nm was close to zero. The elution of proteins was carried with 0.01M HCl + 0.5M NaCl following manufacturer's instructions.

3.5 Trypsin activity

The catalytic activity of the purified enzyme was determined using BApNA (benzoyl-arginine-p-nitroanilide) 8 µM. All purification steps were diluted 1:10 with 0.05 M phosphate buffer pH 8.0 and incubated (30 ml) in triplicate. All steps employed for purification incubated for 15 minutes at 25° C in contact with the substrate. The product released (p-

Nitroaniline) was quantified at 405 nm in microplate reader. One unit of enzyme activity was defined as the amount of enzyme required to hydrolyze 1 μ mol of BApNA per minute.

3.6 Electrophoresis (SDS-PAGE)

Samples of all stages of the purification of proteases were used in sodium dodecylsulphate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE). The gel concentration was 4% and 12.5% to the separating gel. Following the procedure adopted by Laemmli, 1970 [25]. For the method used to vertical electrophoresis system (Vertical Electrophoresis System, Bio-Rad Laboratories, Inc.) Were used as molecular weight standard bovine serum albumin (66kDa), ovalbumin (45kDa), glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase from rabbit muscle (36kDa), bovine carbonic anhydrase (29kDa), bovine pancreatic trypsinogen (24kDa), trypsin inhibitor soybean (20.1 kDa), alpha-lactalbumin and bovine milk (14.2 kDa). Staining the gel was performed with KIT Silver-BULLit™ (Amresco®) following manufacturer's instructions.

3.7 Immobilization fish proteases

The support of immobilization, magnetic-chitosan (10mg), was activated with 12.5% glutaraldehyde dilute in 0.05 M buffer Phosphate pH 8.0 for two hours under gentle agitation at 25°C. The magnetic-chitosan was recovery with magnet followed by 10 washes for complete removal of glutaraldehyde. Time of incubation was determinate in 10 times different (1, 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16 hours) with commercial trypsin (Sigma Chemical Company) to subsidize immobilization of fish proteases. The supernatant was collected and applied 10 washes 1mL each with 0.05 M buffer Phosphate pH 8.0. All washes they had quantity of protein analyzed to $A_{260nm} \times A_{280nm}$ in spectrophotometer. The group chemistry remainders was blocked with glycine 0.1 M for 16 hours at 4°C.

3.8 Effects pH, temperature and storage time

Effects of changes in pH residual activity of the immobilized enzyme were found in the range of 4.5 to 9.0 with different buffer (citrate-phosphate to 4.5–5.5; phosphate 6.0-8.0; tris-HCl 8.5 and NaOH-Glicine 9.0). The thermal stability of the immobilized enzyme was found in the temperature range between 25 and 70°C for 15 min in two repetitions following Amaral *et al.* 2006 [22]. Already the viability of the immobilized enzyme was found in 0, 30 and 60 days of immobilization process conducted. All three stages were estimated by evaluating the activity of the immobilized proteases using BApNA 8µm diluted in DMSO and buffer phosphate 0,05M, pH 8.

3.9 Detection of inhibitors to the commercial feed

Eight types different tips of diets were used (Table 3). Aliquots of each feed were mixed 1:10 with pH 8.0 Tris-HCl 0.1M buffer at 25°C followed by centrifugation at 8,000xg for 5 minutes. All supernatant was collected for use in the detection of anti-nutritional factors. Fractions of supernatant were incubated with the chitosan-magnetic support by 30 minutes. After all this time supernatant was collected. Followed by addition of BApNA to 8mm. The BApNA was in contact with the chitosan-magnetic support for 30 minutes at room temperature and the catalytic activity of the immobilized proteases were measured by the release of p-Nitroaniline at 405 nm in spectrophotometer.

| % | Composition PB | Composition CHO - LP | Corn Meal | Fish Meal | Soybean Meal | Carboxi- metilcelulose | Premix | Soybean Meal | Salt | DL – Metionina | L - Lisina | BHT | Vitamin C | Fosfato Bicalcico |
|---------------|---------------------------|---------------------------------|----------------------|----------------------|-------------------------|-----------------------------------|---------------|-------------------------|-------------|---------------------------|-----------------------|------------|----------------------|------------------------------|
| Diet 1 | 40% | 0% | 35 | 54.47 | - | - | 2 | 8,0 | 0.5 | - | - | 0.1 | 0.001 | - |
| Diet 2 | 35% | 5% | 40,75 | 29.75 | 5 | 1,73 | 2 | 15 | 0.5 | - | - | 0.001 | 0.001 | - |
| Diet 3 | 30% | 10% | 35 | 28 | 10 | 4 | 2 | 20 | 0.5 | 0.5 | 0.5 | 0.01 | 0.001 | - |
| Diet 4 | 25% | 15% | 35 | 13 | 14.69 | 3 | 2 | 30 | 0.5 | 0.5 | 0.5 | 0.01 | 0.001 | 0.8 |
| Diet 5 | 30% | 50% | 50 | 56 | 5 | - | 2 | 1.25 | 0.5 | 0.076 | - | 0.01 | 0.001 | - |
| Diet 6 | 35% | 40% | 40 | 49.53 | 5 | - | 2 | 2.95 | 0.5 | - | - | 0.01 | 0.001 | - |
| Diet 7 | 40% | 30% | 30 | 57.84 | 5 | - | 2 | 4.64 | 0.5 | - | - | 0.01 | 0.001 | - |
| Diet 8 | 45% | 20% | 25 | 67 | 5 | - | 2 | - | 0.5 | - | 0.5 | 0.01 | 0.001 | - |

Table 3. Composition of diets with respect to the percentage protein / carbohydrate-lipid

3.10 Statistical Analysis and Software used

All results outside submitted tests of standard deviation and media utilizing software Microcal™ Origin™ version 8.0.

4. Conclusions

Analyzing the behavior of purified proteases can assume that these are trypsin, actually promotes insights for quicker processes for the purification of proteases that instigates more applications on an industrial scale. Observing the results it is possible to assume that magnetic-chitosan is a great support for immobilization of proteases fish. The parameters show that there is agreement with the results obtained in other studies so that the understanding of the processes of immobilization of purified proteases becomes a little clearer, however it is essential to expand the analysis and considering other points. Importantly, also, that once there is considerable loss of activity with storage times of the immobilized enzyme various applications in biotechnological processes.

Acknowledgments

The Brazilian Council for Scientific and Technological Development - CNPq thanks everyone for their financial support to this study.

References and Notes

1. Stockhausen, B., R.A. Officer, and R. Scott, *Discard mitigation - what we can learn from waste minimization practices in other natural resources?* Marine Policy, 2012. **36**(1): p. 90-95.
2. Esposito, T.S., et al., *Fish processing waste as a source of alkaline proteases for laundry detergent.* Food Chemistry, 2009. **112**(1): p. 125-130.
3. Arvanitoyannis, I.S. and A. Kassaveti, *Fish industry waste: treatments, environmental impacts, current and potential uses.* International Journal of Food Science and Technology, 2008. **43**(4): p. 726-745.
4. Ferraro, V., et al., *Valorisation of natural extracts from marine source focused on marine by-products: A review.* Food Research International, 2010. **43**(9): p. 2221-2233.
5. Isobe, N., et al., *Immobilization of protein on cellulose hydrogel.* Cellulose, 2011. **18**(5): p. 1251-1256.
6. Liu, K., et al., *Lowering the cationic demand caused by PGA in papermaking by solute adsorption and immobilized pectinase on chitosan beads.* Carbohydrate Polymers, 2010. **82**(3): p. 648-652.
7. Seo, D.J., et al., *Immobilization of chitinases from Streptomyces griseus and Paenibacillus illinoisensis on chitosan beads.* Carbohydrate Polymers, 2012. **88**(1): p. 391-394.
8. Singh, A.N., et al., *Glutaraldehyde-Activated Chitosan Matrix for Immobilization of a Novel Cysteine Protease, Procerain B.* Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2011. **59**(11): p. 6256-6262.
9. Moreira, K.A., et al., *Application of protease from Nocardiosis sp as a laundry detergent additive.* World Journal of Microbiology & Biotechnology, 2002. **18**(4): p. 307-312.
10. Marcuschi, M., et al., *Purification, characterization and substrate specificity of a trypsin from the Amazonian fish tambaqui (Colossoma macropomum).* Biochemical and Biophysical Research Communications, 2010. **396**(3): p. 667-673.
11. Esposito, T.S., et al., *Trypsin from the Processing Waste of the Lane Snapper (Lutjanus synagris) and Its Compatibility with Oxidants, Surfactants and Commercial Detergents.* Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2010. **58**(10): p. 6433-6439.
12. Freitas, A.C.V., et al., *Giant Amazonian fish pirarucu (Arapaima gigas): Its viscera as a source of thermostable trypsin.* Food Chemistry, 2012. **133**(4): p. 1596-1602.
13. Bezerra, R.S., et al., *Alkaline proteinase from intestine of Nile tilapia (Oreochromis niloticus).* Process Biochemistry, 2005. **40**(5): p. 1829-1834.
14. Unajak, S., et al., *Characterisation of thermostable trypsin and determination of trypsin isozymes from intestine of Nile tilapia (Oreochromis niloticus L.).* Food Chemistry, 2012. **134**(3): p. 1533-1541.
15. Maciel, J.C., et al., *Preparation and characterization of magnetic levan particles as matrix for trypsin immobilization.* Journal of Magnetism and Magnetic Materials, 2012. **324**(7): p. 1312-1316.
16. Deng, Y.H., et al., *Synthesis of Core/Shell Colloidal Magnetic Zeolite Microspheres for the Immobilization of Trypsin.* Advanced Materials, 2009. **21**(13): p. 1377-1382.
17. Bajpai, S.; Sharma, A.; Gupta, M.N.; *Removal and recovery of antinutritional factors from soybean flour.* Food Chemistry **89** 497–501 2005.

18. Francis, G.; Makkar, H. P. S.; Becker, K. *Antinutritional factors present in plant-derived alternative fish feed ingredients and their effects in fish*. *Aquaculture*. **199**, 197-227. 2001.
19. Chikwati, E.; Venold, F.F.; Penn, M.H. *et al.* *Interaction of soyasaponins with plant ingredients in diets for Atlantic salmon, *Salmo salar* L.* *British Journal of Nutrition* **107**, 1570–1590, 2012.
20. Knudsen, D.; Jutfelt, F.; Sundh, H.; Sundell, K.; Koppe, W.; Frokiaer, H. *Dietary soya saponins increased gut permeability and play a key role in the onset of soyabean-induced enteritis in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.)*. *British Journal of Nutrition*. **100**, 120-129. 2008.
21. Penn, M. H.; Bendiksen, E. A.; Campbell, P.; Krogdahl, A. *High level of dietary pea protein concentrate induces enteropathy in Atlantic Salmon (*Salmo salar* L.)*. *Aquaculture*. **310** (1-4), 267-273. 2011.
22. Kokou, F.; Rigos, G.; Henry, M.; Kentouri, M.; Alexis, M. *Growth performance, feed utilization na non-specific immune response of gilthead sea bream (*Sparus aurata* L.) fed graded levels of bioprocessed soybean meal*. *Aquaculture*. **364-365**, 74-81. 2012.
17. Esposito, T.S., et al., *Surfactants- and oxidants-resistant alkaline proteases from common carp (*Cyprinus carpio* L) processing waste*. *Journal of Food Biochemistry*, 2009. **33**(6): p. 821-834.
18. Wang, Q., et al., *Purification and Characterization of Trypsin from the Intestine of Hybrid Tilapia (*Oreochromis niloticus* x *O.aureus*)*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2010. **58**(1): p. 655-659.
19. Klomklao, S., et al., *Purification and characterization of trypsin from the spleen of tongol tuna (*Thunnus tonggol*)*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2006. **54**(15): p. 5617-5622.
20. Silva, J.F., et al., *Purification and partial characterisation of a trypsin from the processing waste of the silver mojarra (*Diapterus rhombeus*)*. *Food Chemistry*, 2011. **129**(3): p. 777-782.
21. Xu, H., et al., *Preparation of hydrophilic magnetic nanospheres with high saturation magnetization*. *Journal of Magnetism and Magnetic Materials*, 2007. **311**(1): p. 125-130.
22. Amaral, I.P.G., et al., *Fish trypsin immobilized on ferromagnetic Dacron*. *Process Biochemistry*, 2006. **41**(5): p. 1213-1216.
23. Cahu, T.B., et al., *Recovery of protein, chitin, carotenoids and glycosaminoglycans from Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) processing waste*. *Process Biochemistry*, 2012. **47**(4): p. 570-577.
24. Weska, R.F., et al., *Optimization of deacetylation in the production of chitosan from shrimp wastes: Use of response surface methodology*. *Journal of Food Engineering*, 2007. **80**(3): p. 749-753.
25. Laemmli, U.K., *Cleavage of structural proteins during assembly of head of bacteriophage-T4*. *Nature*, 1970. **227**(5259): p. 680-&.

***International Journal of Molecular Sciences* — Instructions for Authors**

Please first read the section '[Aims & Scope](#)' to have an overview, and to assess if your manuscript is suitable for this journal.

Shortcuts

- [Submission](#)
- [Manuscript Preparation](#)
- [Potential Conflicts of Interest](#)
- [Review](#)
- [English Corrections](#)
- [MDPI Publication Ethics Statement](#)
- [CrossCheck/iThenticate](#)
- [Supplementary Material](#)

Please use [a template file](#) to prepare your paper.

Submission of Manuscripts

- **Submission:** Manuscripts should be submitted online at www.mdpi.com by [registering](#) and [logging in](#) to this website. Once you are registered, [click here to go to the submission form](#).
- **Accepted File Formats:**
 - *MS Word:* Manuscript prepared in MS Word must be converted into a single file before submission. When preparing manuscripts in MS Word, the [IJMS Microsoft Word template file](#) must be used. Please do not insert any graphics (schemes, figures, etc.) into a movable frame which can superimpose the text and make the layout very difficult.
 - *LaTeX:* ensure to send a copy of your manuscript as a PDF file also, if you decided to use LaTeX. When preparing manuscripts in LaTeX, please use the [IJMS LaTeX template files](#).
- **Cover letter:** Check in your cover letter whether you supplied at least [5 referees](#). Check if the [English corrections](#) are done before submission.

[\[Return to top\]](#)

Manuscript Preparation

- **Paper Format:** A4 paper format, the printing area is 17.5 cm x 26.2 cm. The margins should be 1.75 cm on each side of the paper (top, bottom, left, and right sides).
- **Formatting / Style:** The paper style of International Journal of Molecular Sciences should be followed. You may download a [template file](#) from International Journal of Molecular Sciences homepage to prepare your paper. The full titles and the cited papers must be given. The style of [Journal of Chemical Information and Computer Sciences](#) is also acceptable. Reference numbers should be placed in square brackets [], and placed before the punctuation; for example [4] or [1-3], and all the references should be listed separately and as the last section at the end of the manuscript.
- **Reference Formatting:** See the [Reference Preparation Guide](#). References should be numbered according to the order in which they appear in the text.
- **Reference Preparation:** References should preferably be prepared with EndNote®, ReferenceManager™ or a similar bibliography software package. If references are prepared manually they must be checked for integrity and correctness (you may use [ISI Web of Knowledge](#), [PubMed/MEDLINE](#) or [Google Scholar](#)). The Editorial Office will charge additional CHF 10 per citation for which extensive corrections must be made.
- **Authors List and Affiliation Format:** Authors' full first and last names must be given. Abbreviated middle name can be added. For papers written by various contributors a corresponding author must be designated. The PubMed/MEDLINE format is used for affiliations: complete address information including city, zip code, state/province, country, and email address should be added. All authors who contributed significantly to the manuscript (including writing a section) should be listed on the first page of the manuscript, below the title of the article. Other parties, who provided only minor contributions, should be listed under Acknowledgments only. A minor contribution might be a discussion with the author, reading through the draft of the manuscript, or performing English corrections.
- **Abstract and Keywords:** The abstract should be prepared as one paragraph (about 200 words). A list of three to ten keywords must be given, and placed after the Abstract.
- **Figures, Schemes and Tables:** Authors are encouraged to prepare figures and schemes in color. Full color graphics will be published free of charge. Figure and schemes must be numbered (Figure 1, Scheme I, Figure 2, Scheme II, etc.) and an explanatory title must be added. Tables should be inserted into the main text, and numbers and titles for all tables supplied. All table columns should have an explanatory heading. Please supply legends for all figures, schemes and tables. The legends should be prepared as a separate paragraph of the main text and placed in the main text before a table, a figure or a scheme.
- **Abstract/Table of Contents Graphic:** Authors are encouraged to provide a graphical representation of the paper (in either JPEG, GIF, PNG or PDF format) to be used as a graphic of the paper, along with the abstract, on the Table of Contents. The graphic should not exceed 500 pixels width/height. As an example, authors may review the abstract graphic of following papers:
 - <http://www.mdpi.com/1424-8220/9/1/490>
 - <http://www.mdpi.com/1420-3049/14/1/378>
- **Electronic Supplementary Information (ESI):** Conference slides, video sequences, software, etc., can be included with the submission and published as supplementary material. Please read the information about [Supplementary Material Deposit](#) beneath.

Potential Conflicts of Interest

It is the authors' responsibility to identify and declare any personal circumstances or interests that may be perceived as inappropriately influencing the representation or interpretation of clinical research. If there is no conflict, please state here "The authors declare no conflict of interest." This should be conveyed in a separate "Conflict of Interest" statement preceding the "Acknowledgments" and "References" sections at the end of the manuscript. Financial support for the study must be fully disclosed under "Acknowledgments" section. It is the authors' responsibility to identify and declare any personal circumstances or interests that may be perceived as inappropriately influencing the representation or interpretation of clinical research. If there is no conflict, please state here "The authors declare no conflict of interest." This should be conveyed in a separate "Conflict of Interest" statement preceding the "Acknowledgments" and "References" sections at the end of the manuscript. Financial support for the study must be fully disclosed under "Acknowledgments" section.

[\[Return to top\]](#)

Review / Referees

Authors should suggest at least five potential referees with the appropriate expertise, although the Editor will not necessarily approach them. Please provide as detailed contact information as possible (address, homepage, phone, e-mail address). The proposed referees should be experts in the field who can provide an objective report - they should not be current collaborators of the authors nor have published with any of the authors of the manuscript within the last 5 years. Proposed referees should be from different institutions than the authors. You may identify appropriate Editorial Board members of the journal as potential referees. Another possibility is to select referees from among the authors that you frequently cite in your paper.

[\[Return to top\]](#)

English corrections

This journal is published in English, so it is essential that for proper refereeing and quick publication all manuscripts are submitted in grammatically correct English. For this purpose we ask that non-native English speakers ensure their manuscripts are checked before submitting them for consideration. We suggest that for this purpose your manuscript be revised by an English speaking colleague before submission. Authors can also use the services of [American Journal Experts \(AJE\)](#) for this purpose. Authors of articles submitted to MDPI journals benefit of a one-time 10% discount on AJE's charges. Simply follow the above link to make use of the referral discount.

[\[Return to top\]](#)

MDPI Publication Ethics Statement

IJMS is a member of the Committee on Publication Ethics ([COPE](#)). MDPI takes the responsibility to enforce a rigorous peer-review together with strict ethical policies and standards to ensure to add high quality scientific works to the field of scholarly publication. Unfortunately, cases of plagiarism, data falsification, inappropriate authorship credit, and the like, do arise. MDPI takes such publishing ethics issues very seriously and our editors are trained to proceed in such cases with a zero tolerance policy.

CrossCheck/iThenticate

IJMS is a member of CrossCheck powered by iThenticate. iThenticate is a plagiarism screening service that verifies the originality of content submitted before publication. iThenticate checks submissions

against millions of published research papers, and billions of web content. Authors are encouraged to use iThenticate to screen their work before submission by visiting www.ithenticate.com.

Supplementary Material Deposit

- We wish to encourage the submission of supplementary data in electronic formats, so that important chemical, structural or scientific information is retained in full. Spectral data (NMR, IR, Raman, ESR, *etc.*) can be submitted in JCAMP (.jdx) format.
- 3D coordinate structures (in pdb, mol, xyz or other common formats), if available, should also be submitted.