

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

CLEDSON BARROS DE SOUZA

ISOLAMENTO E CARACTERIZAÇÃO DA TRIPSINA DO CECO PILÓRICO  
DA ESPÉCIE *Scomberomorus brasiliensis* (SERRA)

Maceió  
2018

CLEDSON BARROS DE SOUZA

ISOLAMENTO E CARACTERIZAÇÃO DA TRIPSINA DO CECO PILÓRICO  
DA ESPÉCIE *Scomberomorus brasiliensis* (SERRA)

Versão corrigida de dissertação de  
mestrado apresentada ao programa  
de Pós-graduação em Química e  
Biotecnologia da  
Universidade federal de Alagoas,  
como requisito parcial para obtenção  
de grau de mestre em ciências

Área de concentração: Bioquímica e  
biotecnologia

Orientador: Prof. Dr. Hugo Juarez  
Vieira Pereira

Maceió  
2018

## Biblioteca Central

### Divisão de Tratamento Técnico

Bibliotecária Responsável: Janis Christine Angelina Cavalcante

S719i Souza, Cledson Barros de.  
Isolamento e caracterização da tripsina do ceco pilórico da espécie  
*Scombermorus brasiliensis* (SERRA) / Cledson Barros de Souza. – 2018.

**61f. : il. color., grafs., tabs.**

Orientador: Hugo Juarez Vieira Pereira.

Dissertação (Mestrado em Bioquímica e Biotecnologia) – Universidade  
Federal de Alagoas. Instituto de Química e Biotecnologia. Maceió, 2018.

**Bibliografia: f. 54-61.**

1. *Scombermorus brasiliensis* – Aspectos bioquímicos e fisiológicos.  
2. Tripsina - Caracterização. 3. Serina Protease. 4. Aplicações biotecnológicas.  
I. Título.

CDU: 577.1:639.3



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



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

**FOLHA DE APROVAÇÃO**

Membros da comissão julgadora da defesa de dissertação de mestrado de **Cledson Barros de Souza**, intitulada: “**Purificação e caracterização da tripsina do *Scomberomorus brasiliensis***”, apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química e Biotecnologia da Universidade Federal de Alagoas, no dia 1 de março de 2018, às 14:00h, na sala de aulas do PPGQB/IQB/UFAL.

**COMISSÃO JULGADORA**

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

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

Prof. Dr. Luciano Aparecido Meireles Grillo  
(ESENFAR/UFAL)

Esse trabalho dedico a todas as pessoas que tenho o privilégio de chamar de amigos e à minha família, Especialmente às matriarcas da família, Maria das Graças, Maria de Lourdes e à dona Jardelina, já falecida a 3 anos, que deixou muita saudade no seio da família toda...

## **AGRADECIMENTOS**

Ao professor e orientador Hugo Juarez Vieira Pereira pela paciência, atenção, apoio e aprendizado.

A minha família pela confiança e dedicação para que eu pudesse chegar até aqui.

Aos amigos pertencentes ou não ao meio acadêmico, pela alegria e pela honra de ter conhecido de tantas pessoas maravilhosas.

Aos colegas de laboratório Cláudio, Elisabeth, Humberto, Tatiele, Dávida, Fabiana, Monizy, Ricardo, Roberto, Janaína, Gabriela, Marta e aos professores Francis e Edma pela companhia e pela ajuda direta e indireta na execução deste trabalho.

A minha namorada, parceira e amiga Juliana Oliveira, pela paciência, carinho e incentivo.

As agências de fomento CNPq e CAPES por prover os recursos que tornaram possível a execução desse projeto de pesquisa.

## RESUMO

*Scomberomorus brasiliensis*, conhecido popularmente como serra no Brasil, é um peixe carnívoro de água salgada encontrado em zona litorânea ao longo de todo o continente americano. É um animal muito consumido no Brasil, com elevado valor socioeconômico para o estado de Alagoas. As tripsinas são moléculas proteolíticas importantes na digestão de vários organismos e que já são utilizadas em diferentes áreas da indústria, como o setor têxtil, alimentício e farmacológico, além de ser bastante utilizada em diferentes áreas de pesquisas científicas. Há a possibilidade de extrair moléculas biológicas importantes como as tripsinas produzidas nas vísceras que são descartadas do animal e que são passíveis de aplicação industrial, o que dá utilidade para os resíduos e contribui para a diminuição da poluição, uma vez que, até 30% do peso desses animais é constituído de resíduos. Foram preparados os extratos de quatro vísceras diferentes, fígado, ceco pilórico, intestino posterior e anterior, sendo detectada maior presença de tripsina no ceco pilórico, extrato do qual se iniciou o processo de isolamento, composto por fracionamento salino e cromatografia por exclusão molecular. A fração 20-40% da precipitação foi aplicada a uma coluna com resina sephacryl S-100 e as frações da cromatografia enumeradas de 15 a 19 apresentaram atividade para a tripsina e a pureza da enzima foi confirmada por SDS-PAGE, apresentando massa molecular aproximada de 26 kDa. A tripsina isolada foi caracterizada através de curvas de temperatura ótima e estabilidade térmica no intervalo de 30 a 70°C, curvas de pH ótimo e estabilidade ao pH no intervalo de 4,0 a 10,0, curva de cinética enzimática com concentrações de substrato de 0,016 a 6 mM e testes de inibição com PMSF, Benzamidina, 2-mercaptoetanol e EDTA. Foi possível extrair uma enzima de importância biotecnológica de resíduos sem valor comercial, isolar e caracterizá-la com sucesso, sendo necessário identificar aplicações para a mesma.

**Palavras-chave:** *Scomberomorus brasiliensis*; Tripsina; Purificação; Serina-protease; Caracterização.

## ABSTRACT

*Scomberomorus brasiliensis*, popularly known as serra in Brazil, is a saltwater carnivorous fish found in the coastal zone along the entire American continent. It is a very consumed animal in Brazil, with high socioeconomic value for the state of Alagoas. Trypsins are proteolytic molecules that are important in the digestion of various organisms and are already used in different areas of industry, such as the textile, food and pharmacological sectors, as well as being widely used in different areas of scientific research. There is the possibility of extracting important biological molecules such as the trypsins produced in the viscera that are discarded from the animal and which can be applied industrially, which gives usefulness to the residues and contributes to the reduction of pollution, since up to 30% of the weight of these animals is composed of residues. The extracts from four different viscera, liver, pyloric cecum, posterior and anterior intestine were prepared, and a higher presence of trypsin was detected in the pyloric cecum, an extract from which the isolation process was started, composed of saline fractionation and chromatography by molecular exclusion. The 20-40% fraction of the precipitation was applied to a column with sephacryl S-100 resin and the chromatography fractions listed 15 to 19 showed activity for trypsin and the purity of the enzyme was confirmed by SDS-PAGE, having approximate molecular mass of 26 kDa. The isolated trypsin was characterized by optimum temperature and thermal stability curves in the range of 30 to 70 ° C, optimum pH and pH stability in the range of 4.0 to 10.0, enzymatic kinetics curve with substrate concentrations 0.016 to 6 mM and inhibition tests with PMSF, Benzamidine, 2-mercaptoethanol and EDTA. It was possible to extract an enzyme of biotechnological importance of residues with no commercial value, to isolate and characterize it with success, being necessary to identify applications for the same.

**Keywords:** *Scomberomorus brasiliensis*; Trypsin; Purification; Serine protease, Characterization.

## LISTA DE GRÁFICOS

- Gráfico 1. Gráfico com curva estimativa de proteínas (em azul) sobreposta por uma curva de atividade (em preto) das frações obtidas desta cromatografia, que mostra uma região de atividade que se estende por cinco frações, no caso as frações 15 a 19.....45
- Gráfico 2. A curva foi feita a partir das atividades da tripsina em diferentes temperaturas, de 30 a 70°C, onde podemos observar que a temperatura de maior atividade pra a enzima isolada ocorreu em 50°C.....48
- Gráfico 3. Curva de atividade residual da tripsina após sua exposição à diferentes temperaturas. Foi considerado 100% de atividade aquela que apresentou a maior temperatura no experimento, que foi a atividade residual correspondente à permanência da enzima em 30°C.....49
- Gráfico 4. Curva de teste de pH ótimo da tripsina do *S. brasiliensis*. A enzima apresentou capacidade de hidrólise do BapNa no intervalo que compreende os pHs de 6 a 10, sendo o ponto de máxima atividade o pH=9,0. Não foram feitos testes de atividade para os pHs acima de 10 pela limitação de uso do substrato cromogênico.....50
- Gráfico 5. Curva referente à estabilidade da tripsina em diferentes pHs. A atividade residual da tripsina em seu pH ótimo é de 58,59%. Já o ponto de maior estabilidade da enzima é o pH=6 que foi considerado 100%.....51
- Gráfico 6. Curva de cinética enzimática da tripsina do *S. brasiliensis*. A enzima apresentou  $K_m=0,3148$  mM.....52
- Gráfico 7. Testes de inibição de atividade da tripsina. Cada coluna corresponde à atividade residual da tripsina quando exposta a diferentes inibidores, todos em concentração de reação de 8 mM.....54

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Exemplar da espécie <i>Scomberomorus Brasiliensis</i> .....	19
Figura 2. Ilustração do mecanismo de catálise das serinas proteases.....	31
Figura 3. Ilustração de reação geral da hidrólise do BapNa pela tripsina.....	32
Figura 4. Perfil das frações da precipitação salina.....	44
Figura 5. Eletroforese em gel de poliacrilamida realizada em condição redutora.....	46
Figura 6. Gel de zimografia da tripsina isolada do ceco pilórico do <i>S. brasiliensis</i> .....	48

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Atividades relativas e absolutas dos extratos preparados.....	42
Tabela 2. Tabela com atividades médias do extrato bruto do ceco pilórico e das frações da precipitação de proteínas.....	43
Tabela 3. Tabela contendo diferentes valores de Km encontrados em diferentes trabalhos de isolamento de tripsinas.....	53

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

BApNA	N-Benzoil-L-arginina-p-nitro-anilida
kDa	Quilodaltons
mg	Miligramas
mL	Mililitros
mM	Milimols
min	Minutos
nm	Nanômetros
EC	Enzyme Commission
PAGE	Eletroforese em gel de poliacrilamida
SBTI	Inibidor de tripsina da soja
SDS	Dodecil Sulfato de Sódio
U	Unidades
uL	Microlitros

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	15
<b>2</b>	<b>REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b> .....	17
2.1	Aquicultura e atividade pesqueira.....	17
2.2	A espécie <i>Scomberomorus brasiliensis</i> .....	17
2.3	Isolamento de proteínas.....	19
2.3.1	Extração de proteínas.....	19
2.3.2	Precipitação salina.....	21
2.3.3	Cromatografia por filtração em gel.....	22
2.4	Enzimas.....	25
2.5	Tripsinas.....	29
2.5.1	Aspectos bioquímicos e fisiológicos.....	29
2.5.2	Aplicações biotecnológicas.....	34
<b>3</b>	<b>OBJETIVOS</b> .....	36
3.1	Objetivo geral.....	36
3.2	Objetivos específicos.....	36
<b>4</b>	<b>MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	37
4.1	Obtenção das vísceras.....	37
4.2	Preparo dos extratos brutos.....	37
4.3	Atividade enzimática.....	37
4.4	Precipitação salina.....	38
4.5	Cromatografia por exclusão molecular.....	38
4.6	SDS-PAGE.....	38
4.7	Temperatura ótima.....	39

4.8	pH ótimo.....	39
4.9	Resistência térmica.....	39
4.10	Resistência ao pH.....	39
4.11	Cinética enzimática.....	40
4.12	Inibição enzimática.....	40
4.13	Zimografia.....	40
4.14	Quantificação de atividade.....	41
<b>5</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO.....</b>	<b>42</b>
5.1	Identificação da estrutura produtora.....	42
5.2	Precipitação salina.....	43
5.3	Cromatografia por exclusão molecular.....	45
5.4	SDS-PAGE.....	46
5.5	Zimografia.....	47
5.6	Temperatura ótima.....	48
5.7	Estabilidade térmica.....	49
5.8	pH ótimo.....	50
5.9	Resistência ao pH.....	51
5.10	Cinética enzimática.....	52
5.11	Inibição enzimática.....	54
<b>6</b>	<b>CONCLUSÃO.....</b>	<b>56</b>
<b>7</b>	<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>57</b>

## 1 INTRODUÇÃO:

A espécie *Scomberomorus brasiliensis* é ocorrente no litoral do nordeste e no estado de Alagoas, possuindo importância econômica e também social, demonstrado por um aumento na pesca dessa espécie de 57% no período entre 2005 e 2006, sendo uma das onze espécies economicamente mais importantes de zona litorânea e estuarina em Alagoas (PROJETO DE DESENVOLVIMENTO SUSTENTÁVEL DA PESCA E DA AQUICULTURA AMBIENTAL, 2008), movimentando a mais de 1,85 milhões de reais no estado (QUINTAS, 2006). Do consumo desse animal, como de vários peixes, há subaproveitamento da biomassa. Todas as partes que não sejam o tecido muscular esquelético do animal são descartadas.

Sendo o animal importante do ponto de vista comercial, torna-se econômica e ambientalmente interessante buscar formas de aproveitar ao máximo a biomassa desses animais (FREITAS-JÚNIOR et al, 2012; BOUGATEF et al., 2007; SOUZA et al., 2007). Incentiva-se, por exemplo, o aproveitamento dessa biomassa através da extração de moléculas para serem usadas na indústria. Ao fazer esse aproveitamento, direciona-se um tratamento para partes que apenas se somariam aos números dos resíduos orgânicos desperdiçados, o que reduz a poluição (LU et al., 2008; BOUGATEF, 2013). Como exemplo de aplicação de partes usualmente descartadas, está o aproveitamento da pele de tilápias como auxiliar cicatrizante em queimados (ALVES et al., 2015).

Uma das possibilidades para a extração de biomoléculas com aplicações potenciais de uso é a extração de tripsina das vísceras do *S. brasiliensis*. As tripsinas são enzimas proteolíticas do grupo das serino proteases, que agem sobre as regiões carboxílicas de resíduos de arginina e lisina (KURTOVIC; MARSHALL; SIMPSON, 2006). É uma proteína que atua na digestão de outras proteínas e é capaz de ativar outras enzimas proteolíticas secretadas em suas formas inativas, sendo capaz inclusive de ativar mais moléculas de tripsina (KURTOVIC; MARSHALL; SIMPSON, 2006). É geralmente resistente em uma ampla faixa de pHs, temperaturas e também sob exposição de diferentes agentes potencialmente desnaturantes (ESPÓSITO et al., 2009; KLOMKLAO et al., 2005).

A tripsina é utilizada para diversos fins dentro da indústria, como produção de proteínas recombinantes, fabricação de detergentes para lavagem de roupas, tratamento de problemas de pele, cicatrização de feridas, processamento de couro, seda e de alimentos, fazendo parte de formulações de amaciadores de carne comerciais (SHI; MARSHALL; SIMPSON, 2007), servindo para recuperar prata de chapas usadas de raios-x (GUPTA; BEG; LOREZ, 2002), carotenoides de restos de camarão (SILA et al., 2012), auxiliar na extração de DNA de ossos em meio forense ou em estudos antropológicos (LI; LIRIANO, 2011).

Por ser uma enzima com muitas possibilidades de uso e pelo fato da tripsina do *S. brasiliensis* poder se destacar em algumas de suas características específicas, de forma a ser utilizada em uma ou mais aplicações, torna-se necessário isolar a enzima para então caracteriza-la. Com os dados de caracterização, pode-se avaliar a possibilidade de utilizá-la de alguma forma em algum processo.

## 2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA:

### 2.1 Aquicultura e atividade pesqueira:

A pesca e a atividade aquícola são práticas crescentes e de grande importância econômica no Brasil e no mundo (FAO, 2016). Segundo o relatório de 2016 da Organização de Alimentação e Agricultura, afirma que o consumo per capita mundial anual chegou aos 20 kg em 2014, um acréscimo significativo com relação aos 19,2 kg em 2012. A aquicultura é a atividade agropecuária com resposta produtiva mais rápida, portanto capaz de responder ao aumento da população mundial de forma bastante satisfatória, sendo uma das possibilidades no combate da fome ao redor do globo (SHELTON, 2014). O cultivo de pescado em cativeiro vem sendo praticado em todo o mundo, com crescente participação de países em desenvolvimento na expansão não apenas dessa prática, como também na pesca (SHELTON, 2014).

Projeta-se um crescimento da atividade aquícola de até 40% em 2025, com a possibilidade de crescimento produtivo pesqueiro brasileiro crescer em 104% na próxima década, sendo o maior crescimento projetado na América latina (FAO, 2016). No entanto, em meio ao aumento populacional humano e à geração de resíduos sólidos que provocam poluição ambiental, é uma preocupação cada vez maior a expansão dessas atividades de forma sustentável e por consequência, alternativas de processamento de resíduos provenientes de processamento e consumo de animais marinhos (EMBRAPA, acesso 2017).

### 2.2 A espécie *Scomberomorus brasiliensis*:

*Scomberomorus brasiliensis* é uma espécie de peixe carnívoro marinho, conhecidamente predador de sardinhas, peixes voadores (SUZUKI, 1983; ARAÚJO; CHELLAPPA, 2002), mas também de outros peixes menores e em menor extensão, de cefalópodes e camarões (COLLETTE; RUSSO; ZAVALA-CAMIN, 1983). É um animal pertencente ao filo chordata, da classe actinopterygii, da ordem perciformes e família scombridae. Alguns autores referenciaram no passado a espécie *Scomberomorus Maculatus* equivocadamente como um sinônimo para as aparições dessa espécie na costa do atlântico do Caribe e da América central. Possui de

dezessete a dezenove espinhos dorsais, quinze a dezenove raios dorsais, que dão sustentação às nadadeiras dessa região, dois acúleos anais e dezesseis a vinte raios anais (COLLETTE; RUSSO; ZAVALA-CAMIN, 1983). Possuem em geral de quarenta e sete a quarenta e nove vértebras e possui a região nasal mais curta que o resto da cabeça, com um corpo coberto por pequenas escamas, duas nadadeiras pélvicas pequenas, com uma linha lateral corporal que se curva à medida que se aproxima da região caudal (figura 1). Não possui bexiga natatória e possui um intestino com duas dobras, dividido em três regiões. Possui escamas prateadas com manchas arredondadas e amareladas ao longo do corpo (COLLETTE; RUSSO; ZAVALA-CAMIN, 1983).

É uma espécie de peixe relativamente grande, encontrado no litoral do Caribe e nas regiões litorâneas de Belize e ao longo da costa brasileira do nordeste até a região sul (COLLETE et al., 1978). Frequentemente presente em águas costeiras e habitante de regiões epipelágicas, formam frequentemente cardumes e se locomovem por entre zonas estuarinas (SILVA, 2005). É uma espécie de peixe muito importante na pesca artesanal principalmente nas regiões norte e nordeste e para a prática pesqueira no Brasil (EIRAS et al., 2014, CHELLAPPA et al., 2010, COSTA; LACERDA, 2009). O serra é consumido geralmente fresco, às vezes sendo salgado ou enlatado no Brasil, além do processamento envolver frequentemente refrigeração (COLLETTE; RUSSO; ZAVALA-CAMIN, 1983).

A captura da espécie *Scomberomorus brasiliensis* no norte e nordeste é feita principalmente com redes-de-espera e em menor extensão, com linha-e-anzol, sendo feitas em pescarias de “ir e vir” realizadas entre 15 e 21 metros de profundidade em horários noturnos e diurnos. Em regiões litorâneas de diversos estados nordestinos brasileiros, o serra é uma espécie que sempre é capturada por utilização de redes-de-espera e a porcentagem dessa espécie varia de acordo com diferentes períodos do ano e a região onde é feita a coleta dos espécimes (LUCENA et al., 2004).

Figura 1. Exemplar da espécie *Scomberomorus brasiliensis*.



Fonte: <https://de.wikipedia.org/>

## 2.3 Isolamento de proteínas:

### 2.3.1 Extração de proteínas:

As proteínas são moléculas muito versáteis funcionalmente, podem ser moléculas componentes de estruturas de sustentação, poros de membranas, canais iônicos, transportadores, catalisadores, sinalizadores, receptores, moléculas de defesa, entre outras funções. Embora seja possível estudar funções biológicas de proteínas em uma amostra com vários contaminantes, quanto mais isolada essa proteína está, mais evidente será sua atividade. A presença de outras moléculas em uma amostra biológica interfere na determinação de parâmetros bioquímicos importantes, quando se quer determinar inequivocamente características intrínsecas da proteína, são aplicadas técnicas de isolamento.

A proteína a ser estudada deve ser extraída do tecido que a contém, ou dos micro-organismos que a produzem. As proteínas podem ser extraídas de qualquer ser vivo uni ou pluricelular, sendo primeiro passo para a execução de um isolamento. É preciso liberar o conteúdo intracelular do tecido produtor da proteína em questão e isso é feito por meio da destruição máxima do tecido a conter a proteína. Isso pode ser feito com maceração utilizando almofariz e pistilo, ou outros utensílios de trituração manual como tesouras. Pode-se extrair proteínas por lise osmótica, digestão enzimática e solubilização química, que são métodos considerados leves. Se o tecido ou estrutura é menos lábil, mais resistente, podem ser usados trituradores, liquidificadores e outros aparelhos com capacidade de reduzir ao máximo o tamanho de partícula do tecido. O uso de sonicadores e de prensa francesa são os métodos mais severos de extração enzimática.

No processo de extração geralmente é usado um tampão de extração que pode facilitar a extração, mas principalmente deve ser capaz de manter a proteína íntegra. Para proteínas com função biológica, a escolha do tampão e da molaridade é muito importante para viabilizar a continuidade do processo de isolamento, pois se a proteína se desnaturar, pode não ser possível renaturá-la posteriormente. A solução tampão é escolhida com base no meio biológico em que a proteína age, buscando a concentração e o pH mais próximos possíveis dessas condições. Podem ser usados também diversos agentes para auxiliar a extração de enzimas, como inibidores, agentes redutores, detergentes, que geralmente são evitados pela possibilidade de comprometer a viabilidade da proteína de interesse.

Para a extração de tripsina, geralmente são usadas soluções tampão que variam de levemente alcalinas às muito alcalinas. Souza et al. (2007) utilizou apenas uma solução de NaCl 0,9% para a extração da tripsina dos intestinos e cecos pilóricos da espécie *Pseudupeneus maculatus*. Antes da extração, as vísceras foram dissecadas e lavadas com água destilada, para só então fazer a extração através de um aparelho homogenizador. Uso de solventes orgânicos, soluções tampões ou adição de sais, principalmente CaCl<sub>2</sub> e NaCl são presentes na metodologia de vários trabalhos.

Sila et al. (2012) e Bougatef (2010) fizeram lavagens das vísceras em água deionizada e depois com solução tampão alcalina Tris-HCl pH=8,0 10 mM, que é um pH próximo ao do intestino de animais vertebrados de forma geral. Entretanto a extração da tripsina foi feita em acetona fria com aparelho homogenizador, onde foi coletado o material insolúvel em acetona que foi filtrado, seco e depois suspenso na solução tampão em que foi lavada. Sriket et al. (2012) também extraiu tripsina em acetona e resuspendeu o material insolúvel em acetona seco, mas em solução tampão que Villalba-Villalba et al. (2013) fez a extração da enzima de interesse, Tris-HCl 50 mM pH=7,5 com adição de NaCl a 500 mM e CaCl<sub>2</sub> a 10 mM. Cai et al. (2011) também realizou sua extração em mesmas condições que Villalba-Villalba, porém com uma concentração menor de CaCl<sub>2</sub> e sem NaCl. Todos os autores anteriormente citados executam ao menos uma centrifugação no homogenato feito com as vísceras do animal de trabalho, onde o sobrenadante gerado é coletado e chamado de estrato bruto.

Khangenbam; Yvr; Chakrabati (2012) usou um homogenizador para preparar o extrato bruto em solução tampão Tris-HCl pH=8 10 mM CaCl<sub>2</sub> 10 mM. No entanto, aplicou um método diferente para remover os lipídeos, adicionando o extrato a uma solução de 1% de EDTA contendo coágulos de queijo pré-tratados, onde foi deixado por 12 horas, posteriormente sendo centrifugado, permitindo a remoção manual da gordura manualmente. Depois de todo esse processo, a fase líquida foi filtrada a vácuo, sendo chamado de extrato bruto. A extração em acetona remove parte das gorduras da amostra quando aplicada.

### 2.3.2 Precipitação salina:

Após a extração de proteínas do tecido ou células de origem, pode se dar início o processo de separação dos contaminantes da proteína alvo. Existem diferentes técnicas que podem ser usadas para isolar proteínas, sendo a cromatografia de proteínas o método mais eficaz para esse fim. Entretanto, nem sempre uma amostra pode ser levada a uma cromatografia imediatamente após o preparo do extrato. Existem muitas possibilidades para o isolamento de qualquer proteína, muitas vezes envolvendo mais de uma cromatografia. A amostra pode também passar por tratamento térmico, lavagem com solventes, filtração, entre outros. Um método bastante empregado para a eliminação de contaminantes é a precipitação de proteínas.

A precipitação de proteínas consiste em remover contaminantes da amostra por adição crescente e gradual de um agente que seja capaz de remover diferentes proteínas em diferentes frações da amostra. É possível precipitar proteínas por adição de solventes orgânicos (etanol, propanona), por alteração do pH adicionando ácidos ou bases ou através da adição de sais geralmente inertes. A precipitação salina é uma técnica que é muito empregada para a remoção de contaminantes de uma amostra antes do uso de um método mais acurado de isolamento de proteínas. É usado principalmente em extratos de tecidos animais e vegetais, geralmente usando sais inertes como o cloreto de sódio e o sulfato de amônio.

A precipitação salina se baseia no princípio de *salting out*, que é a capacidade de remover proteínas do estado solúvel por adição de sal. Quanto maior a quantidade de sal adicionada a uma solução contendo proteínas, maior a quantidade

de interações intermoleculares entre a água e o sal, que é mais facilmente solvatado do que as proteínas. As proteínas passam a competir com o sal pelas interações com o solvente, geralmente ligações de hidrogênio e forças de Van Der Waals, que as mantêm em solução. É possível precipitar algumas proteínas isoladamente com uma quantidade precisa de sal enquanto as outras permanecem em solução, mas é uma técnica que é usada para remoção ampla de contaminantes, não é esperado o isolamento de proteínas apenas com o uso da precipitação por ser uma técnica de baixa resolução.

A precipitação de proteínas é muito empregada nos trabalhos de isolamento de tripsinas, pois é um método de grande capacidade e pode remover boa parte dos contaminantes de um extrato antes que possa ser feita um método mais preciso de isolamento (BOUGATEF, 2013). Diferentes autores aplicam precipitação proteica para diminuir a quantidade de contaminantes do extrato. Freitas-Junior et al. (2012) aplicou tratamento térmico do extrato bruto do ceco pilórico do pirarucu, mantendo-o aquecido a 45°C por 10 min, seguido de centrifugação a 4°C. Depois disso foi feita uma precipitação salina com sal sulfato de amônio em três frações. Lu et al. (2008) e Bezerra et al. (2005) Também executaram fracionamento salino com sal sulfato de amônio em três frações do extrato, tendo Bezerra anteriormente usado tratamento térmico prévio. Já Espósito et al. (2009) aplicou aquecimento no extrato bruto dos intestinos e cecos pilóricos do *C. Macropomum* e posteriormente usou etanol para separa os constituintes dos extratos em 3 faixas.

### 2.3.3 Cromatografia por filtração em gel:

A cromatografia líquida de proteínas é a técnica de isolamento mais empregada atualmente. Existem diversas rotas de purificação que utilizam um ou mais métodos cromatográficos. Na cromatografia de proteínas é necessário ao menos uma bomba de fluxo para eluir a amostra com a fase móvel, uma coluna cromatográfica contendo a fase estacionária e algum meio de coleta das frações geradas na cromatografia. Atualmente, é crescente o uso de sistemas cromatográficos automatizados, com uma grande variedade de tipos de resinas a serem usadas como fases estacionárias. As resinas produzidas industrialmente são

compostas por polissacarídeos, possuindo ou não resíduos de acrilamida em suas cadeias.

Essas resinas são produzidas como várias microesferas, que além dos polissacarídeos estruturais, podem possuir ou não grupos químicos com uma grande variedade de características, que são escolhidas pelo tipo de cromatografia a ser executada. As soluções de corrida das cromatografias líquidas de proteínas geralmente são soluções-tampão aquosas de molaridades e pHs variados a depender do tipo de cromatografia e do tipo de amostra a ser aplicada. As amostras geralmente são eluídas no mesmo tampão em que foram extraídas, para assegurar a manutenção das características da enzima nativa.

A cromatografia por filtração em gel ou exclusão molecular é um tipo de cromatografia que consiste em separar os constituintes de uma amostra através de sua massa molecular. As resinas de filtração em gel apresentam partículas com vários microporos de diferentes diâmetros, onde as moléculas menores passam pelos menores poros e as maiores moléculas pelos maiores poros. A partir do momento em que a amostra é aplicada no topo de uma coluna de filtração em gel, seus componentes avançam ao longo da coluna em diferentes velocidades, fazendo movimentos em “zigue-zague”. As moléculas maiores avançam mais rapidamente ao longo da cromatografia porque essas moléculas podem atravessar apenas os poros maiores presentes nas partículas da resina. Já as moléculas menores permanecem mais tempo nas pequenas passagens existentes no interior das microfibras, pois há uma maior variedade de caminhos ao longo destas.

A filtração em gel é uma técnica cromatográfica não adsorptiva, geralmente usada para separação por grupos ou dessalinização de amostras, pois a cromatografia consiste em separar as moléculas por massa, sem que haja interações significativas de quaisquer componentes da amostra com a resina. Entretanto, componentes de uma amostra podem exibir afinidade com a fase estacionária, ainda que isso seja indesejado. Para diminuir a chance de interação entre amostra e fase estacionária, recomenda-se então para as soluções de corrida usadas nesse tipo de cromatografia que sejam preparadas com 0,5 M de sal cloreto de sódio, pelo menos.

O volume de amostra que pode ser aplicado nesse tipo de cromatografia é pequeno em comparação com outros tipos de cromatografia, variando de 0,5 a 4% do volume total da coluna. A recomendação geral é de aplicação de no máximo 2% do volume da coluna e 0,5% para a separação de complexos. Recomenda-se antes da aplicação centrifugar a amostra para a remoção de partículas em suspensão. Mesmo em sistemas automatizados, a aplicação de amostra em coluna de exclusão molecular pode ser feita manualmente, com a aplicação sobre o topo da coluna diretamente na resina.

Após a entrada completa por gravidade da amostra na resina, é iniciada a corrida cromatográfica em um determinado fluxo. Além do volume de amostra, outro parâmetro que pode ser alterado para aumentar a resolução de uma cromatografia de exclusão molecular é a altura da coluna, de forma que a resolução aumenta num fator de dois ao quadruplicar a altura do leito. Quanto maior a coluna, maior a resolução. O fluxo também influi na resolução da filtração em gel de forma que quanto menor a vazão, maior tende a ser a resolução. No entanto, diminuir o fluxo acarreta uma diminuição da velocidade da cromatografia. O tamanho dos *beads*, ou seja, das microesferas da resina também afeta a resolução, mas é um parâmetro definido pelo fabricante e não pode ser alterado em laboratório.

À medida que o fluxo se inicia, os diferentes constituintes da amostra avançam pela coluna através dos microporos da resina, mais rapidamente os maiores e mais lentamente os menores. Uma vez iniciada a cromatografia, o solvente que percorre a coluna durante a corrida é coletado em tubos que podem ser de diferentes materiais. Uma vez estabelecido quantos volumes de coluna a percorrerão, normalmente 1 a 1,5 volume de coluna, é estabelecido qual o volume de cada fração a ser coletado em cada tubo. Quanto maior o fracionamento, maior a chance de obter êxito no isolamento de qualquer proteína, portanto, sendo necessário um maior número de frações à medida que o volume das frações diminui.

As maiores proteínas de uma amostra saem da coluna na mesma velocidade de fluxo da fase móvel, numa região do cromatograma que é o volume morto ou *void*. O volume morto é o volume resultante da subtração do volume total do volume útil de cromatografia, que equivale a aproximadamente 30% do volume das colunas

de filtração em gel. A resolução de um pico de absorvância no comprimento de onda de 280 nm é dada pela largura do pico a meia altura, onde quanto mais fino um pico, melhor a resolução em sua separação. Teoricamente, os constituintes de uma amostra seriam todos eluídos após um volume de coluna. Entretanto, alguns constituintes de uma amostra podem interagir com a matriz fracamente, aumentando sua retenção e possibilitando a saída de algumas moléculas após um volume de coluna. Após o uso da coluna, ela deve ser lavada com no mínimo um volume de água ultrapura e depois com metanol ou etanol a 20% no mínimo, onde deve ser mantida enquanto a coluna não estiver sendo usada.

No isolamento de tripsinas, podem ser usadas resinas de diferentes tipos para cromatografar as amostras. São comuns os usos de cromatografias de troca aniônica e de exclusão molecular no isolamento de tripsinas de diferentes espécies de peixes. Sriket et al. (2012) descreveu uma rota com uma coluna de troca aniônica Q-Sepharose, uma coluna de exclusão molecular Sephadex G-75 e uma trocadora aniônica forte, que é a coluna de resina mono-q. Costa et al. (2013) executou um único procedimento cromatográfico com cromatografia de exclusão molecular Sephadex G-75 em seu trabalho. Ktari et al. (2012) usou duas cromatografias na rota de isolamento, uma filtração em gel Sephadex G-100 e uma trocadora de ânions mono-q e Nasri et al. (2012) relatou o uso de uma única cromatografia de filtração em gel no isolamento de tripsina da espécie *Z. ophiocephalus*. Também são usadas cunas de afinidade para o isolamento das tripsinas, como exemplo, o trabalho de Shi, Marshall e Simpson (2007) que realizaram um isolamento com uma única cromatografia por afinidade com resina contendo SBTI. Freitas-Junior et al. (2012) também definiu sua rota de isolamento de tripsina com uma coluna de afinidade, esta composta de agarose e benzamidina, que foi executada após uma filtração em gel.

#### 2.4 Enzimas:

Enzimas são catalisadores biológicos de reações específicas que agem, do ponto de vista termodinâmico, por meio de diminuição da energia de ativação, que é a barreira energética que deve ser alcançada pelos reagentes para que estes se convertam em produtos. A grande maioria das enzimas é proteica, com a exceção

notável das ribozimas, que são complexos com propriedade catalítica formado de RNA. A energia de ativação de uma dada reação para a conversão de reagentes em produtos é a energia livre de Gibbs, representada pelo símbolo  $\Delta G$ . É a energia livre que define se uma determinada reação é espontânea ou não, ou seja, se é uma reação favorável. Uma reação espontânea sempre possui um  $\Delta G$  negativo. No entanto, uma reação espontânea não necessariamente é uma reação rápida. De fato, várias reações espontâneas são muito lentas de se ocorrer fora do meio biológico.

Uma enzima é uma molécula que em um microambiente é capaz de estabilizar meta-estados ou estados de transição de forma a orientar a conversão de reagentes em produtos. Quando estamos falando de reações catalisadas por enzimas, a molécula para a qual a enzima possui afinidade é o substrato, e a maioria das enzimas agem apenas em um único substrato e catalisam essa reação em velocidade muito maior do que se estivesse ocorrendo de forma espontânea. A enzima apenas aumenta a velocidade de uma reação, ela nunca consegue alterar o equilíbrio entre substrato e produtos. Obter determinados metabólitos a partir de reações enzimáticas, ser capaz de transformar moléculas do ambiente é uma característica importante de seres vivos, e também para indústria em variadas áreas, pois reações catalisadas por enzimas são meios rápidos de obter em quantidades maiores certos produtos. Isso se deve também ao fato de que uma enzima é capaz de catalisar inúmeras vezes aquela reação que ela facilita sem que a enzima seja perdida no processo.

A reação de transformação de substratos e produtos por meio de uma enzima pode ser representada da seguinte forma:



Onde E é a enzima, S é o substrato e P é o produto. Resultante de um primeiro contato entre enzima e substrato, temos a formação de um complexo ES que pode ou não se converter no complexo EP, que seria uma etapa antes da liberação de produtos e enzimas livres. Entre a conversão de ES em EP temos a presença de uma espécie química que faz interações fracas em um bolsão da enzima que é chamado de sítio ativo. Pode ser necessária a formação de mais de

uma estrutura intermediária no sítio ativo, que são produzidas por consequência das interações fracas entre aminoácidos envolvidos na reação catalítica e o substrato, estabilizando meta-estados e orientando para a formação de produtos. Em condições ótimas para a enzima, a formação de um complexo ES leva à formação de EP que gera produto e enzima livres. A frequência com que a interação entre substrato e enzima não resulta na formação de produtos é pequena, já que as constantes das reações no sentido dos produtos são maiores. Enzimas, em condições propícias podem ser usadas para produzir moléculas que elas normalmente usam como substratos, como já foi realizado com as lípases que podem ser usadas como sintetizadores de triacilgliceróis ou tripsinas usadas para formar ligações peptídicas.

Algumas enzimas podem precisar de moléculas ou íons metálicos associados à sua estrutura tridimensional para executar a sua função de catálise. As moléculas que se associam à porção polipeptídica das enzimas para que essa desempenhe sua função são chamadas de coenzimas, que são vitaminas ou derivados dessas moléculas, enquanto os íons metálicos que agem na proteção à desnaturação e na capacidade de catálise dessas enzimas são chamados de cofatores. A porção polipeptídica isolada é chamada de apoenzima, que associada ao seu cofator, é chamada de holoenzima. O sítio ativo das enzimas é uma região que se liga ao substrato e aos cofatores e contém resíduos de aminoácidos que agem sobre o substrato por meio de formação e quebra de ligações.

Embora haja muitos tipos diferentes de enzimas, com mecanismos de ação e funções variadas, há algumas generalizações com relação ao sítio ou local ativo da enzima. A primeira delas é que o centro ativo é uma fenda tridimensional composta por diferentes partes de resíduos de aminoácidos da enzima. O centro ativo é uma parte pequena da molécula com relação ao volume total, sendo o único local da enzima em contato com o substrato, mesmo que as enzimas sejam moléculas relativamente grandes. O restante da enzima é o alicerce para a construção dessa região ativa da enzima, que podem conter outras regiões de regulação, de interação proteica e canais. O espaço na fenda do sítio ativo é muito pequeno e em geral, mesmo a água que circunda a maior parte do ambiente externo ao sítio ativo não está presente, a menos que ela seja um reagente.

Os substratos se ligam ao sítio ativo por meio de ligações fracas, dentre as quais podem participar ligações de hidrogênio, forças de Van Der Waals, interações eletrostáticas e interações hidrofóbicas. A especificidade de uma enzima ao seu substrato depende do arranjo de porções de diferentes aminoácidos no local ativo da enzima, de forma que a enzima seja capaz de englobar o substrato no sítio para a sua conversão nos produtos. A enzima precisa ter flexibilidade para que o substrato chegue ao sítio ativo e possa ser convertido em produto (BERG; TYMOCZO; STRYER, 2012).

A cinética enzimática estuda as reações catalisadas por enzimas e, portanto as interações entre a enzima e o substrato em questão, mas principalmente a velocidade das reações enzimáticas. A velocidade das reações enzimáticas é obtida por reações efetuadas *in vitro*, ou seja, por reações realizadas em condições controladas fora de um sistema vivo, sendo essa velocidade calculada pelo observador em detrimento da conversão de substrato a produtos em dado período de tempo. As condições para o cálculo da velocidade máxima ( $V_{max}$ ) de uma reação enzimática são basicamente uma baixa concentração de enzima fixa que é submetida a crescentes concentrações de um substrato (S). Outro conceito importante relativo à cinética é o da velocidade inicial ( $V_0$ ) que pode ser obtido pelo monitoramento de 60 segundos de reação em concentrações de enzima na ordem de nanomols e concentrações de substrato pelo menos 5 vezes maiores que as da enzima. Em concentrações baixas de S, o  $V_0$  aumenta de forma linear em resposta ao aumento do substrato, já em concentrações altas em relação à enzima se observa um acréscimo cada vez menor com a adição de substrato. Quando a atividade se torna constante independente do aumento de concentração do substrato, é alcançada a velocidade máxima ( $V_{max}$ ). Abaixo a equação que calcula a constante de Michaelis-Menten ou  $K_m$ :

$$V_0 = \frac{V_{max} [S]}{[S] + K_m}$$

O  $K_m$  é um dado experimental que pode ser obtido para qualquer enzima e qualquer substrato e denota a concentração em que a enzima alcança metade da velocidade máxima da reação. Em geral, quanto menor o  $K_m$ , maior é a velocidade de conversão do substrato pela enzima em questão. O  $K_m$  pode ser determinado

para todas as enzimas exceto aquelas que possuem sítios alostéricos, portanto para as enzimas regulatórias não é possível estabelecer esses dados a partir da equação de Michaelis-Menten, são as enzimas alostéricas, de comportamento não Michaeliano.

As enzimas são classificadas de acordo com NC-IUBMB (*Nomenclature Committee of the International Union of Biochemistry and Molecular Biology*) em seis classes diferentes: Oxidorredutases, Transferases, Hidrolases, Liases, Isomerases e Ligases. Essa divisão se baseia no tipo reação catalisada pela enzima. Oxidorredutases catalisam reações de óxido-redução, transferases transferem grupos químicos entre moléculas, hidrolases quebram ligações por meio de adição de moléculas de água, liases removem água, amônia e dióxido de carbono por quebra de ligações duplas, isomerases convertem moléculas em seus isômeros e ligases ligam substratos para gerar produtos. Para cada enzima há um número que a identifica segundo a EC (Enzyme Commission), que é representado pela sigla E.C., seguido de quatro algarismos, separados por pontos que, da esquerda para a direita, correspondem ao tipo de reação que catalisa, o tipo de substrato, os resíduos envolvidos na reação e um número que a identifica das demais de mesmo grupo (NELSON; COX, 2014).

## 2.5 Tripsina:

### 2.5.1 Aspectos bioquímicos e fisiológicos:

As enzimas digestivas mais importantes são proteases ácidas estomacais e proteases alcalinas intestinais. A tripsina (EC 3.4.21.4) é uma das principais proteases presentes em cecos pilóricos e intestinos de peixes (SILA et al., 2012). A tripsina foi a primeira enzima descoberta e provavelmente a mais bem caracterizada de todas (BOUGATEF, 2013). Na classificação EC, todas as proteases são de classe 3.4, que são hidrolases que agem sobre ligações peptídicas, sendo as proteases 3.4.11-19 todas exopeptidases, que agem em resíduos nas extremidades da cadeia peptídica e 3.4.21-24 codificando para as endopeptidases, que são enzimas que desfazem ligações entre aminoácidos no meio da cadeia (BOUGATEF, 2013). Exopeptidases podem agir em extremidades carboxílicas ou amínicas, sendo denominadas carboxipeptidases ou aminopeptidases, respectivamente.

Exopeptidases geralmente são ligadas à membrana celular ou são intracelulares e tem seu uso como produto dificultado (BOUGATEF, 2013).

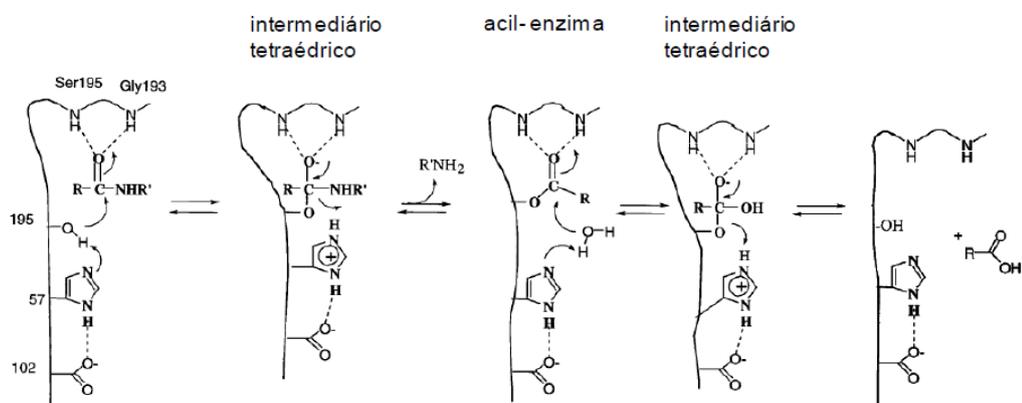
É uma enzima da família das serina-proteases em que o mecanismo catalítico está relacionado a três resíduos de aminoácidos presentes no sítio catalítico, que são os resíduos de aspartato, histidina e serina. As tripsinas são ativas sobre regiões carboxílicas de resíduos de arginina e lisina envolvidos em ligações peptídicas, desfazendo ligações peptídicas por reações de hidrólise (RYPNIEWSKI et al., 1994). A tripsina é uma das três principais serino-proteases digestivas, sendo a segunda a quimotripsina, que quebra ligações peptídicas envolvendo os aminoácidos aromáticos triptofano, fenilalanina e tirosina. A terceira das serino-proteases alcalinas mais importantes é a elastase, que age sobre aminoácidos com cadeias laterais de menor tamanho, são a glicina, a valina e a alanina. A preferência da elastase pelos aminoácidos menores está ligado ao menor volume de seu sítio catalítico (YANG et al., 2015).

A figura mostra a reação de catálise da tripsina. O mecanismo catalítico da tripsina depende dos resíduos de serina, histidina e aspartato nas posições 195, 57 e 102 na estrutura primária, respectivamente. Existe a participação de outros dois resíduos, um de serina e outro de glicina que ancoram o polipeptídeo no sítio de ligação através de interações de hidrogênio com o oxigênio da carboxila presente nos resíduos de arginina ou lisina. Para a ação hidrolítica da tripsina, é importante que uma hidroxila desimpedida do resíduo de serina no sítio catalítico se ative através de desprotonação decorrente da proximidade dessa hidroxila do anel imidazólico da histidina, que também interage com a carboxila da cadeia lateral do aspartato do sítio por ligação de hidrogênio. Na presença do polipeptídeo no sítio, o oxigênio da serina ataca o carbono do grupo carbonil, e o próton deslocado da ativação da serina é acomodado em um nitrogênio da cadeia lateral da histidina.

É gerado então um intermediário tetraédrico que desloca um par de elétrons para o oxigênio do grupo carbonil, tornando-o parcialmente negativo, que é estabilizado pelas interações no bolsão chamado oxiânion, onde estão a glicina e a serina a interagir com o polipeptídeo (NELSON; COX, 2014). Quando a dupla ligação no grupo carbonil é restaurada por rearranjo de pares de elétrons, rompe-se

a ligação peptídica entre o carbonil e o grupo amino, facilitada pela protonação do anel imidazólico da histidina. A água presente no sítio é desprotonada, onde a hidroxila efetua um novo ataque nucleofílico ao carbono carbonílico, juntamente com uma nova protonação da cadeia lateral da histidina, que levam a formação de um intermediário tetraédrico. A ligação dupla carbonílica é novamente restaurada, colocando a serina do sítio catalítico no seu estado inicial e liberando a segunda parte do polipeptídeo no meio, condicionando a enzima para a próxima hidrólise.

Figura 2. Ilustração do mecanismo de catálise das serinas proteases.



Fonte: Redstrom, 2002.

A tripsina age como uma proteína digestiva no intestino, não apenas nos peixes, mas também em mamíferos, com a capacidade de ativar outras enzimas digestivas além de ativar mais moléculas dela própria. No caso de animais superiores, como mamíferos e aves, a tripsina é produzida no pâncreas (DEVLIN et al., 2011; RYPNIEWSKI et al., 1994), enquanto nos peixes as tripsinas podem ser produzidas no intestino, cecos pilóricos ou hepatopâncreas (BOUGATEF, 2013). A estrutura e propriedades de tripsinas de mamíferos vêm sendo muito estudadas ao longo dos anos (KOSSIAKOF et al., 1977).

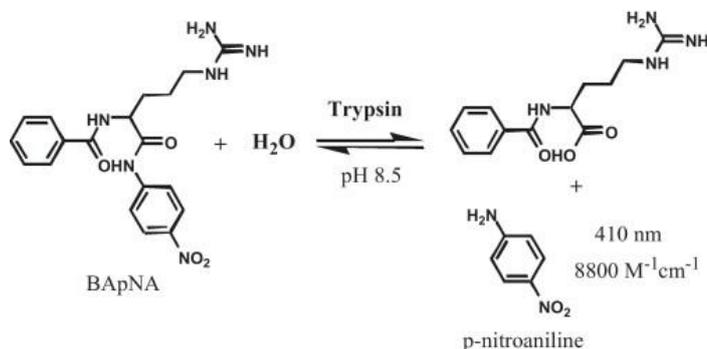
Muitas tripsinas e enzimas tripsina-símiles já foram isoladas e caracterizadas de invertebrados marinhos, peixes de águas frias e tropicais (JELLOULI et al., 2009; LU et al., 2008; KANNO et al., 2010; BEZERRA et al., 2001; MARCUSCHI et al., 2010; SANTOS et al., 2016; KLOMKLAO et al., 2006; SILVA et al., 2011). Embora as tripsinas de peixes sejam bastante semelhantes às enzimas correspondentes em

mamíferos, são relatadas variações em suas eficiências catalíticas e sua estrutura (FONG; CHAN; LAU, 1998). As proteases de peixes vêm apresentando maiores atividades catalíticas em uma faixa ampla de pH e temperaturas com concentrações relativamente menores (SHAHIDI; KAMIL, 2001; HAARD; 1998).

Para saber se há tripsina em uma amostra, é necessário alguma forma de detectá-la, portanto ao fazer extratos e nas frações geradas pelos métodos de separação de proteínas, são usados substratos cromogênicos. São substâncias que mimetizam substratos naturais das enzimas e que ao serem clivados, liberam substâncias capazes de produzir uma determinada coloração. Existem substratos cromogênicos que podem ser usados para verificar se há tripsina em uma amostra e também para quantificar sua atividade.

Ainda que os substratos não reproduzam com exatidão a interação entre proteínas reais e a tripsina, eles são ferramentas importantes nos estudos de caracterização bioquímica. Um substrato comercial usado para caracterização da tripsina bem como sua detecção em amostras é o N $\alpha$ -Benzoyl-L-arginine-p-nitroanilide (BapNa). Como mostrado na figura, a tripsina ao interagir com o grupo carbonil da molécula, leva a uma reação de hidrólise da ligação envolvendo esse grupo, que libera a p-nitroanilida, que é um composto cromóforo que absorve luz no comprimento de onda em torno de 410 nm, enquanto reflete a cor amarela na solução enzimática como resposta positiva à presença da tripsina.

Figura 3. Ilustração de reação geral da hidrólise do BapNa pela tripsina.



Fonte: Hinterwirth; Lindner; Lämmerhofer, 2012.

As serinas proteases são inibidas por di-isopropil fosfluoreto (DFP) e tendem a apresentar atividade em pH neutro e básico, de uma forma geral, se tornando inativas ou instáveis em pH ácido (SIMPSON, 2000; FUCHISE et al., 2009). O fenil-metil-sufonil-fluoreto (PMSF) é outro inibidor inespecífico de serinas proteases, enquanto o inibidor de tripsina da soja (SBTI) e a aprotinina são inibidores específicos das tripsinas.

As tripsinas existem em diferentes espécies de peixes, que podem produzir mais de uma isoforma dessa enzima e possuem massa molecular frequentemente variando entre 22 kDa e 30 kDa, com atividades ótimas em temperaturas variando de 35 a 65°C e faixas ótimas de pH de 7,5 a 11. Alguns estudos foram feitos para a elucidação do efeito de íons metálicos sobre as tripsinas, onde o sódio e o potássio geralmente não alteram a atividade de tripsinas de forma significativa e  $\text{Cd}^{2+}$ ,  $\text{Co}^{2+}$  e  $\text{Hg}^{2+}$  possuem sabidamente capacidade de inibir parcialmente as tripsinas por mecanismo de interação desses íons divalentes com grupos sulfidríla da tripsina, que são pontos da molécula importantes para a sua atividade (BEZERRA et al., 2001, 2005; BOUGATEF et al., 2007; SOUZA et al., 2007).  $\text{Ag}^{2+}$  e  $\text{Hg}^{2+}$  podem mudar a carga elétrica de reagentes envolvidos nas reações catalisadas pelas tripsinas, podendo aumentar a fase de contato entre a enzima e os reagentes (BOUGATEF et al., 2010; JELLOULI et al., 2009; KTARI et al., 2012).

Os íons cálcio divalentes são importantes para estabilidade de tripsinas de peixes, bem como para aquelas de mamíferos (KISHIMURA et al., 2006). Existem dois sítios de ligação do tripsinogênio bovino com o cálcio, um que está presente na forma ativa e na inativa e outro exclusivo do tripsinogênio, onde o primeiro sítio ocupado com o cálcio é capaz de proteger a enzima de desnaturação térmica e autólise (BOUGATEF, 2013). O aumento da atividade das tripsinas quando em presença de íons divalentes de cálcio talvez ocorra devido ao fortalecimento de interações no interior da enzima e por ligação do cálcio a locais suscetíveis à autólise (BOUGATEF, 2013). O cálcio é capaz de aumentar a estabilidade térmica das tripsinas, algo que aumenta a viabilidade das proteases, pois elas tendem a aumentar sua atividade em altas temperaturas (BOUGATEF, 2013). O cálcio também induz a tripsina a uma estrutura mais compacta (KIM et al., 1994; KLOMKLAO et al., 2004).

Proteases alcalinas vêm ganhando importância ao longo dos últimos anos por serem enzimas com notável resistência térmica, pHs extremos e presença de agentes desnaturantes como surfactantes e agentes oxidantes (KLOMKLAO et al., 2006). Como os peixes são animais poiquilotermicos, dependem da adaptação de suas enzimas à temperatura ambiente (LU et al., 2008), de modo que eventualmente são encontradas proteases de peixes de ambientes frios exibindo maior atividade enzimática em baixas temperaturas que as enzimas encontradas em mamíferos (AHSAN; WATABE, 2001; KRISTJANSSON, 1991). Enzimas com alta atividade em baixas temperaturas podem ser apropriadas o processamento de alimentos de origem animal, como carnes e laticínios (HAARD, 1992).

#### 2.5.2 Aplicações biotecnológicas:

Proteases são moléculas muito importantes, representam aproximadamente 50% de todas as enzimas usadas na indústria (TURK, 2006). Há muitas possibilidades de utilização dessa classe de enzimas, como na indústria de detergentes, alimentícia, agroquímica e farmacêutica entre outras (GUPTA; BEG; LORENZ, 2002; ZUKOWSKI, 1992). Proteases podem ser obtidas de diferentes organismos, como animais, plantas e bactérias, e vários estudos mostram que as vísceras de peixes podem ser fontes de proteases alcalinas (FREITAS-JÚNIOR et al., 2012). A Aplicação de serino proteases vem sendo realizadas na indústria de detergentes, alimentícia, farmacêutica, processamento de couro e seda (KLOMKLAO et al., 2005). A utilização de vísceras de peixe para a obtenção de enzimas alcalinas pode ser uma alternativa ecologicamente interessante de diminuir a poluição pelo descarte desses resíduos e minimizar perdas econômicas (BOUGATEF et al., 2007; SOUZA et al., 2007).

As tripsinas podem ser usadas para amadurecimento do queijo, produção de hidrolisados proteicos, produção de tempero de soja, recuperação de proteínas da carcaça de peixes após filetagem (SOUZA et al., 2007). Também podem ser usadas para recuperação de carotenoides de resíduos de consumo e processamento de camarão (SILA et al., 2012). Incorporação em formulações de detergentes, processamento de couro, na indústria química e mesmo no tratamento de resíduos (BOUGATEF, 2013).

Também são utilizadas na desagregação de células de cultura de mamíferos, na produção de proteínas recombinantes, na terapia contra cânceres, para tratamento de acne, feridas de pressão, para auxílio na digestão, no tratamento de dores, inflamação, artrite, tendinites, úlceras e hemorroidas. São usadas no diagnóstico de diabetes, produção de hidrolisados proteicos e amaciadores de carne comerciais (SHI; MARSHALL; SIMPSON, 2007).

A utilização das tripsinas e de outras enzimas alcalinas é especialmente importante para a fabricação de detergentes para lavagem de roupas, pois podem hidrolisar proteínas em manchas de diferentes fontes, como sangue ou leite, sendo 60% de toda a encomenda da tripsina no da indústria é no uso em fórmulas de limpeza (BOUGATEF, 2013). Uma enzima destinada a ser incorporada em formulações de detergentes deve manter-se ativa e estável em diferentes temperaturas (BANIK; PRAKASH, 2004). Também deve ser compatível com diferentes componentes da formulação de detergentes, que pode envolver surfactantes, agentes oxidantes e outras substâncias potencialmente hostis às proteínas (KUMAR; TAKAGI, 1999; GUPTA et al., 1999).

### **3 OBJETIVOS:**

#### 3.1 Objetivos gerais:

Isolar e caracterizar a tripsina da espécie *Scomberomorus brasiliensis*.

#### 3.2 Objetivos específicos:

- 1 - Identificar o local de produção e armazenamento da(s) tripsina(s);
- 2 - Preparar extrato do(s) tecido(s) produtor(es) da tripsina;
- 3 - Fazer separação de frações do extrato por meio de precipitação de proteínas;
- 4 - Aplicar a(s) fração(ões) com maior concentração de tripsina em cromatografia líquida rápida de proteínas;
- 5 - Confirmar pureza e massa molecular aproximada da(s) tripsina(s);
- 6 - Avaliar resistência térmica e temperatura ótima;
- 7 - Avaliar resistência ao pH e pH ótimo;
- 8 - Montar curva de cinética enzimática;
- 9 - Fazer testes de inibição com diferentes inibidores enzimáticos.

## **4 MATERIAIS E MÉTODOS:**

### **4.1 Obtenção das vísceras:**

Vísceras foram obtidas de espécimes destinados a consumo humano da vila dos pescadores da praia de Jaraguá, Maceió, Alagoas. Os animais tiveram vísceras do tubo digestivo retirados após captura, que foram congeladas e transportadas em isopor com gelo até o laboratório, onde foram mantidos a  $-20^{\circ}\text{C}$  até o momento de processamento do material. Todos os experimentos foram aprovados pela CEUA sob o número 70/2017.

### **4.2 Preparo de extratos brutos:**

Foram feitos extratos brutos das vísceras de provável obtenção da tripsina, especificamente da porção anterior do intestino, dos cecos pilóricos e da porção posterior do intestino, por meio de recorte das vísceras, adição de tampão Tris-HCl 50 mM pH=8.0 numa proporção de 1g para 1 mL de solução tamponante. Após homogeneização da víscera com as vísceras cortadas e homogeneizadas com bastão de vidro em tampão A, foram feitas duas centrifugações a 15000 xg, 15 min, a  $4^{\circ}\text{C}$ , coletando o sobrenadante e descartando o precipitado. O sobrenadante final após as centrifugações foi chamado de extrato bruto.

### **4.3 Atividade enzimática:**

O Teste de atividade para a enzima foi feito após o preparo dos extratos brutos para saber qual estrutura continha a enzima de interesse e, posteriormente, após cada passo do isolamento da enzima, com a adição de 10  $\mu\text{L}$  de enzima ou 10  $\mu\text{L}$  de uma diluição de 1:100 no caso das reações com o extrato bruto e frações de precipitação salina. Também foram adicionados 2  $\mu\text{L}$  de uma solução de 50 mM de BapNa ( $\text{N}\alpha$ -Benzoil-D,L-arginina-4-nitroanilida) e 488  $\mu\text{L}$  de tampão Tris-HCl 50 mM pH=8,0 encubados a  $37^{\circ}\text{C}$ , por 40 min, sendo então adicionados 500  $\mu\text{L}$  de ácido cítrico a 20% para interromper a reação. As leituras foram feitas em triplicata em comprimento de onda de 410 nm em espectrofotômetro.

#### 4.4 Precipitação salina:

No extrato com maior atividade foi realizado o fracionamento por meio de adição de sal sulfato de amônio em cinco faixas, 0-20%, 20-40%, 40-60%, 60-80% e 80-100%, de acordo com em Santos et al., 2016 com modificações. As centrifugações foram feitas com 15 min, a 15000 xg, 4°C. A fração com melhor atividade foi aplicada em uma coluna para cromatografia de proteínas.

#### 4.5 Cromatografia por exclusão molecular:

Foi aplicada a fração de maior atividade advinda da precipitação salina em uma coluna de exclusão molecular com resina Sepharose S-100, com fluxo de 0,1 mL/min, volume de leito de 50 mL, nas dimensões de 60x1 cm conectado a um sistema AKTA (GE). Após o equilíbrio da coluna com 1,5 volume de coluna, foi aplicado o volume de 300 uL da fração escolhida, dando início à cromatografia onde foram coletados 2 mL por fração. Das frações foram avaliadas a presença de proteína pela absorbância da amostra no comprimento de onda de 280 nm e a atividade pela hidrólise do BapNa. As frações com atividade para o substrato cromogênico da tripsina foram levadas à eletroforese.

#### 4.6 Eletroforese (SDS-PAGE):

Foi feita uma eletroforese em condição redutora em géis de poliacrilamida de empilhamento e separação nas concentrações de 5 e 15% respectivamente, segundo descrito em Laemmli, 1970. O tampão das amostras continha de 0.5 M Tris-HCl pH 6.8; 2% SDS; 10% Glicerol; 5% 2-Mercaptoetanol; 0,001% de azul de Bromofenol e aquecida por 5 min a 100°C. A corrida foi feita a voltagem constante de 90 mV e a revelação das proteínas foi feita por exposição do gel à solução de comassie blue G-250 4% em overnight seguida imersão em solução descorante composta por 10% de ácido acético, 40% Metanol e 50% de H<sub>2</sub>O. Foi utilizado padrão de massa molecular Rainbow (GE).

#### 4.7 Temperatura Ótima:

A curva de temperatura ótima foi obtida a partir de reações enzimáticas compostas por 10 uL de enzima, 390 uL de tampão Tris-HCl pH=8,0 50 mM e 100 solução reveladora (2 uL de BapNa em concentração de 50 mM + 98 uL de tampão Tris-HCl pH=8,0 50 mM) que foram encubadas por 180 min nas temperaturas de 30, 40, 50, 60 e 70°C. Para cada temperatura testada foi feita uma triplicata. Para interromper as reações, foram adicionados 500 uL de ácido cítrico a 20%.

#### 4.8 pH Ótimo:

Foi obtida uma curva de atividades em diferentes pHs através do preparo de reações enzimáticas compostas por 10 uL de enzima, 390 uL de tampão de teste e 100 uL de solução reveladora (2 uL de BapNa em concentração de 50 mM + 98 uL de tampão de teste) de soluções tampão nos pHs 4,5,6,7,8,9 e 10. Para os pHs no intervalo de 4 a 6 foram usados tampões de teste Acetato-NaOH, no pH 7 foi usado tampão Fosfato-NaOH, no pH 8 foi usado o tampão Tris-HCl, enquanto nos pH 9 e 10 foram usados tampões Glicina-NaOH. Foram feitas triplicatas das reações de atividade pra cada pH, todas encubadas por 180 min a 50°C e interrompidas com a adição de 500 mL de acido cítrico a 20%.

#### 4.9 Resistência térmica:

Foram feitas encubações de 10 uL de enzima em 390 uL de solução tampão Glicina-NaOH pH=9,0 a 100 mM por 60 min nas temperaturas de 30, 40, 50, 60 e 70°C. Após a exposição às temperaturas de teste, foram adicionados 100 uL de solução reveladora (2 uL de BapNa em concentração de 50 mM + 98 uL de tampão Glicina-NaOH 100 mM) em cada triplicata, mantendo todas as reações agora sob a temperatura de 50°C. As reações foram mantidas por 180 min e depois interrompidas com a adição de 500 uL de acido cítrico a 20%.

#### 4.10 Resistência ao pH:

Foram feitas encubações de 10 uL de enzima em 390 uL das soluções tampão a 100 mM nos mesmos pHs testados no experimento de pH ótimo por 60 min. Em seguida foram adicionados 100 uL de solução reveladora (2 uL de BapNa

em concentração de 50 mM + 98 uL de tampão Glicina-NaOH 300 mM) em cada triplicata de cada encubação. Essas reações foram mantidas por 180 min a 50°C e então interrompidas pela adição de 500 uL de ácido cítrico a 20%.

#### 4.11 Cinética enzimática:

Foram medidas as atividades da tripsina isolada adicionando 10 uL de enzima em 390 uL de solução tampão Glicina-NaOH 100 mM pH=9,0 e 100 uL da solução reveladora contendo o mesmo tampão e concentrações crescentes do substrato cromogênico BapNa (0,016, 0,0313, 0,063, 0,125, 0,25, 0,5, 1, 4 e 6 mM). As reações foram encubadas por 180 min, a 50°C em triplicata para cada concentração e então encerradas com a adição de 500 uL de ácido cítrico a 20%.

#### 4.12 Inibição enzimática:

As reações de inibição foram montadas em triplicata para quatro inibidores diferentes e o controle positivo, sendo os inibidores o EDTA, 2-mercaptoetanol, PMSF e Benzamidina, todos em concentrações nas respectivas reações de 8 mM. Primeiro adicionou-se 20 uL de inibidor as misturas contendo 370 uL de solução tamponante Glicina-NaOH pH=9,0 100 mM e 10 uL de enzima pura. No controle positivo foi adicionado tampão glicina-NaOH no lugar de quaisquer inibidores. Todas as misturas foram encubadas por 20 min, 50°C e em pH=9,0. Após o tempo de encubação, as reações receberam 100 uL de solução reveladora (2 uL de BapNa em concentração de 50 mM + 98 uL de tampão Glicina-NaOH 300 mM), sendo então novamente submetidas a 50°C e Tampão Glicina-NaOH pH=9,0 por 180 min. Por fim, as reações foram encerradas por adição de 500 uL de ácido cítrico 20%.

#### 4.13 Zimografia:

Foi feita o teste de atividade proteolítica da enzima através da produção de gel de poliacrilamida de acordo com Laemmli 1970, substituindo a água por uma solução de caseína a 0,4 %. Foi aplicada então a tripsina do *S. brasiliensis* com o tampão de amostra usado no SDS-PAGE, porém sem a presença de 2-mercaptoetanol e sem aquecer a amostra. A corrida foi feita a voltagem constante de 90 mV e após o fim da eletroforese, o gel foi submetido a duas lavagens de 15 min

cada em solução de triton x-100 2,5%. A seguir, o gel foi mantido em tampão glicina-NaOH 100 mM pH=9,0 por 120 min. Ao término desse período, o gel foi imerso em solução de comassie blue G-250 4% em overnight, sendo o gel descorado em solução composta por 10% de ácido acético, 40% Metanol e 50% de H<sub>2</sub>O.

#### 4.14 Quantificação de atividade enzimática:

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

$$\text{Atividade (U/mL)} = \frac{(A-A_0) \times \text{volume final de mistura (mL)} \times 10^{-6}}{8800 \times \text{tempo de reação (min)} \times 0,2 \text{ (mL)}}$$

8800 M<sup>-1</sup> cm<sup>-1</sup> é o coeficiente de extinção do p-nitroanilina; A e A<sub>0</sub> são a leitura das amostras e do branco a A<sub>410</sub> nm respectivamente.

## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO:

### 5.1 Identificação de estrutura produtora:

Após preparo e medida da atividade da tripsina nos diferentes extratos, foram obtidos os seguintes resultados:

Tabela 1. Atividades relativas e absolutas dos extratos preparados, onde é possível que a atividade de hidrólise de BapNa está presente em dois dos quatro extratos testados, onde a maior atividade relativa e absoluta foi do Ceco Pilórico.

	Atividade (U/mL)	Atividade Total (U)
<b>Fígado</b>	0	0
<b>Ceco Pilórico</b>	0,8541	1152,9
<b>Intestino Anterior</b>	0	0
<b>Intestino Posterior</b>	0,1392	6,959

Fonte: Elaborado pelo autor

As atividades hidrolíticas do substrato BapNa foram observadas em apenas dois extratos, o da porção posterior ao ceco pilórico em menor quantidade e o do ceco pilórico propriamente dito. Como os extratos foram preparados respeitando a mesma proporção de volume de solução tampão por grama de tecido, é possível afirmar que a diferença das quantidades de enzima entre eles é real. Com relação aos tecidos testados, foi possível observar a maior atividade, e conseqüentemente maior ocorrência, da enzima de interesse no ceco pilórico, que foi selecionado para seguir com os estudos de isolamento. Como em outros estudos, foi encontrada a presença de tripsina no ceco pilórico, que é uma estrutura conhecidamente capaz de produzir proteases alcalinas (ESPÓSITO et al., 2009; FUCHISE et al., 2009; SANTOS et al., 2016; KHANTAPHANT; BENJAKUL, 2010).

É possível que as absorvâncias medidas das duas porções do intestino também sejam referentes à isoformas da tripsina, pois já foi realizada extração de tripsinas de intestinos de peixe (ESPÓSITO et al., 2009; KIM; JEONG, 2012) e também de hepatopâncreas (CAI et al., 2011; KIM et al., 1994). No entanto, não se

descarta a possibilidade de que a atividade visualizada na porção posterior do intestino se deva a uma menor quantidade da mesma enzima produzida nos cecos pilóricos. Para saber se essa atividade enzimática é oriunda de isoformas da enzima ou da mesma molécula isolada, é necessário executar o isolamento da enzima em todas as estruturas com presença de tripsina e submeter essas proteases à espectrometria de massas.

## 5.2 Fracionamento salino:

Após execução do fracionamento salino, foram observadas as seguintes médias de atividades do extrato bruto e das frações:

Tabela 2. Tabela com atividades médias do extrato bruto do ceco pilórico e das frações da precipitação de proteínas, onde as maiores atividades estão nas faixas de saturação de sal correspondentes a 20-40% e 40-60% respectivamente.

Frações	Atividades (U/mL)	Atividades(U)
Extrato Bruto	118,27	1597,05
0-20%	80,54	60,41
20-40%	422,25	422,3
40-60%	428,40	556,92
60-80%	130,30	169,39
80-100%	6,53	0,882

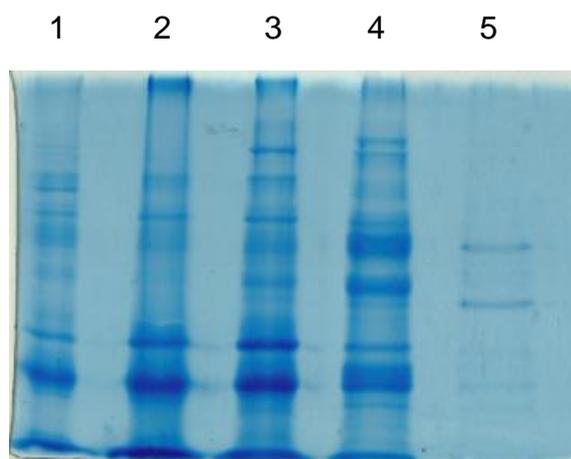
Fonte: Elaborado pelo autor

Os resultados do fracionamento salino do extrato em cinco partes mostram que há efetiva concentração da atividade da enzima em relação à atividade do extrato bruto, que indica que houve uma remoção significativa de contaminantes das frações que apresentam maior atividade e enriquecimento da atividade trípica.

O grande aumento da atividade aparente da enzima nas frações centrais pode ser explicado pela remoção de contaminantes que aumentam a probabilidade de contato efetivo de uma enzima com o seu substrato, no caso o BapNa. Quando aplicadas as frações da precipitação, é possível observar a diminuição de contaminantes, tanto na fração 20-40% quanto na 40-60%. A atividade ter se

concentrado em duas frações pode significar a presença de diferentes isoformas da tripsina, uma em cada fração. Outros autores foram capazes de isolar diferentes isoforma da tripsina produzidas pela mesma espécie (SOUZA et al., 2007; LU et al., 2008) Das duas frações com maior atividade, a fração de 20-40% foi levada à cromatografia líquida de proteínas por exclusão molecular por apresentar menos contaminantes que a fração 40-60% (Figura 4).

Figura 4. Perfil das frações da precipitação salina. Da esquerda para direita: 0-20%(1), 20-40%(2), 40-60%(3), 60-80%(4) e 80-100%(5). É possível observar que a canaleta 2 possui menos contaminantes que a canaleta 3, sendo a fração 20-40% escolhida para fazer a cromatografia. Se cada banda visível é uma proteína, quanto menos proteínas a fração tiver, mais simples tende a ser seu isolamento.



Fonte: Elaborada pelo autor

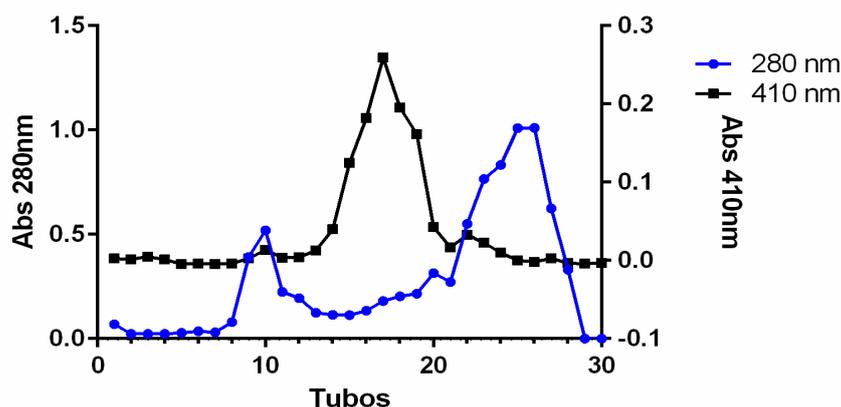
A precipitação salina é uma técnica bastante aplicada como método de pré-purificação, podendo concentrar tripsinas em diferentes frações. Também é muito variada a recuperação do mesmo método em diferentes tripsinas (SANTOS et al., 2016; CAI et al., 2011; NASRI et al., 2012; KTARI et al., 2012). Sila et al. (2012) Obteve 64,2% como recuperação da precipitação com sulfato de amônio, enquanto Villalba-Villalba et al. (2013) obteve 71,6% de recuperação de tripsina. Santos et al. (2016) obteve recuperação de 86,97%. No entanto, o método pode exibir recuperações muito pequenas, como por exemplo, a recuperação obtida do fracionamento salino executado em Nasri et al. (2012), que foi de 0,66%. Khantaphant; Benjakul (2010) obtiveram recuperação de 32,2% correspondente a

faixa de saturação de 40-60%. A recuperação do método neste estudo foi de 81,31%, onde a recuperação da fração aplicada foi de 26,44%.

### 5.3 Cromatografia por exclusão molecular:

Após aplicação da amostra em coluna de S-100 Sepharose (50 ml) de filtração em gel, foram coletadas alíquotas de 2 mL que tiveram medidas suas atividades e a estimativa da presença de proteínas, a partir das quais foi gerado o gráfico abaixo:

Gráfico 1. Gráfico com curva estimativa de proteínas (em azul) sobreposta por uma curva de atividade (em preto) das frações obtidas desta cromatografia, que mostra uma região de atividade que se estende por cinco frações, no caso as frações 15 a 19.



Fonte: Elaborado pelo autor

É possível observar uma região de atividade pelo pico que se desenha das frações 14 a 20, com as maiores atividades se localizando dos tubos 15 a 19. Na curva relativa à presença de proteínas, a absorbância na região de atividade é baixa, porém ela se mostra crescente. Colunas de filtração em gel são bastante empregadas no isolamento de tripsinas e muitas rotas propostas para tal fim já foram delineadas (SILA et al., 2012; SOUZA et al., 2007; FREITAS-JÚNIOR et al., 2012; SRIKET et al., 2012; VILLALBA-VILLALBA et al., 2013).

Sendo assim, são colunas eficientes em separar proteínas com grande diferença de massa molecular. Geralmente são usadas mais de uma coluna para uma rota de isolamento de tripsinas (SILA et al., 2012; SOUZA et al., 2007;

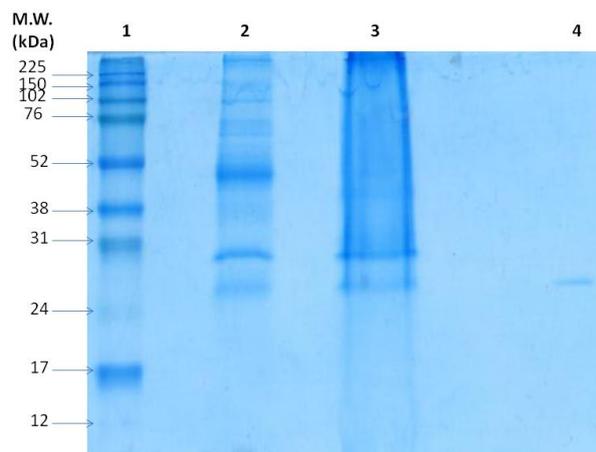
FREITAS-JÚNIOR et al., 2012; SRIKET et al., 2012; VILLALBA-VILLALBA et al., 2013), e quanto mais cromatografias necessárias para o isolamento, menor a viabilidade econômica daquele método, o que é importante quando se busca propor um método de aproveitamento de resíduos pela indústria (BOUGATEF, 2013). Entretanto, já foi relatado êxito na purificação de tripsinas com um único passo cromatográfico (BEZERRA et al., 2005; BOUGATEF et al., 2007).

Após a execução do processo cromatográfico e verificação da existência de atividade de frações, é necessário submeter as amostras contendo tripsina em uma eletroforese em gel de poliacrilamida para confirmar se a enzima estudada foi de fato isolada depois da cromatografia por exclusão molecular e estimar sua massa molecular. A recuperação dessa cromatografia foi de 5,55%. A recuperação de cromatografias de exclusão molecular varia, Khaled et al. (2011) mostrou recuperação de 9,2% em uma cromatografia em resina Sephadex S-100 que foi um dos passos para ao isolamento de três isoformas diferentes da espécie *S. aurita*. Já Nasri et al. (2012) obteve recuperação de 20% em cromatografia Sephadex G-100. Kim; Jeong (2012) em resina Superdex G-75, obtiveram rendimento de 4,7% na rota de isolamento descrita para a tripsina do *P. olivaceus*, Cai et al. (2011) documentou o isolamento de duas isoformas de tripsinas da espécie *L. japonicus*, uma catiônica e uma aniônica apresentando recuperações de 5,8 e 2,1% respectivamente, após filtração em gel Sephacryl S-200.

#### 5.4 Eletroforese (SDS-PAGE):

Foi feita eletroforese em gel de poliacrilamida em condições redutoras, que posteriormente foi corada por solução de 8% de *Comassie Blue* e depois descorada, que resultou no gel abaixo:

Figura 5. Resultado de corrida eletroforética sucedida de coloração e descoloração de amostras das etapas da purificação. Da esquerda para a direita, 1-Padrão de massa molecular, 2-Extrato bruto do ceco pilórico, 3-Fração da precipitação salina 20-40%, 4-Fração 18 da cromatografia em gel filtração. A fração da última canaleta contém apenas uma banda e possui atividade amidase sobre o BapNa com massa molecular aproximada de 26 kDa.



Fonte: Elaborado pelo autor

É possível notar que a amostra na canaleta 4 apresenta apenas uma banda marcada pelo corante, que mostra a presença de uma única entidade proteica nessa fração. Também é possível notar que cada etapa reduziu de forma significativa a quantidade de espécies proteicas que originalmente estavam presentes no extrato. Aliado ao fato de que a amostra aplicada apresenta atividade de hidrólise do substrato específico do BapNa, é possível afirmar que a enzima foi isolada efetivamente pela rota proposta. O rendimento da cadeia de purificação da tripsina do serra presente na fração 20-40% da precipitação salina apresentou rendimento de 5,55%.

Quanto ao fato da enzima apresentar massa aproximada de 26 kDa, outras tripsinas apresentam massas muito próximas da que foi encontrada neste trabalho. Sila et al. (2012) isolou do *Barbus callensis* uma tripsina de 24 kDa, bem como Komklao et al. (2010) e Kanno et al. (2010) isolaram enzimas de mesma massa aproximada. Barkia et al. (2010) e Elhadj-Ali et al. (2010) isolaram tripsinas de 23 kDa, Ktari et al. (2012) e Bougatef et al. (2007) isolaram tripsinas de 27 e 25 kDa respectivamente. Já foi isolada uma tripsina com massa molecular de 38,5 kDa do *Colossoma macropomum* por Bezerra et al. (2000).

### 5.5 Zimografia:

A eletroforese nativa com matriz impregnada com caseína resultou no gel que vemos abaixo:

Figura 6. Gel de zimografia da tripsina isolada do ceco pilórico do *S. brasiliensis*. O rastro claro que corta o gel ao meio é fruto da atividade da enzima nativa isolada sobre a caseína que foi incorporada no gel, esta que corresponde a toda a área corada pelo comassie blue.



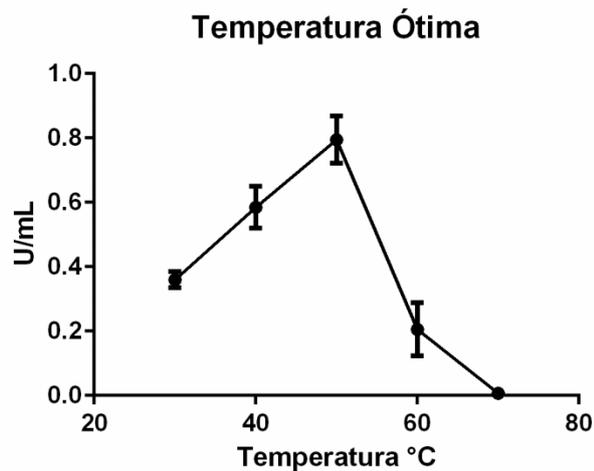
Fonte: Elaborado pelo autor

A zimografia ou zimograma é um experimento que possibilita afirmar que uma enzima é capaz de hidrolisar um substrato em meio semissólido. Neste trabalho, a zimografia mostra que a enzima isolada é de fato uma protease, pois ela consegue digerir as proteínas presentes na matriz gelatinosa. Usualmente se espera visualizar clareamento do gel apenas em torno da área em que a enzima se encontra no gel. A canaleta inteira tornou-se mais clara provavelmente pela alta concentração de proteína no gel (0.4%), que aumentou a resistência ao avanço da amostra na eletroforese.

#### 5.6 Temperatura ótima:

Abaixo a curva de atividades em diferentes temperaturas da tripsina isolada:

Gráfico 2. A curva foi feita a partir das atividades da tripsina em diferentes temperaturas, de 30 a 70°C, onde podemos observar que a temperatura de maior atividade para a enzima isolada ocorreu em 50°C.



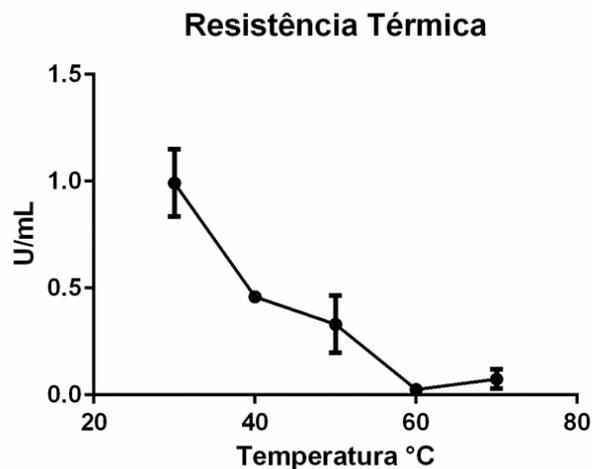
Fonte: Elaborado pelo autor

As temperaturas ótimas de tripsinas de diferentes espécies de peixes frequentemente se encontram no intervalo que vai de 45 a 65°C (BOUGATEF, 2013). No caso da tripsina isolada em nosso estudo, a temperatura ótima foi de 50°C. Diversos outros trabalhos encontraram a mesma temperatura ótima de 50°C (KISHIMURA et al., 2007; CASTILLO-YANEZ et al., 2005; KHALED et al., 2011; BOUGATEF et al. 2010; KISHIMURA et al., 2010; MARCUSCHI et al., 2010; ELHADJ-ALI et al., 2010). Após 50°C a atividade diminui cada vez mais por iniciar processo de desnaturação da estrutura tridimensional da proteína, fazendo com que a sua atividade diminua até a ausência completa a 70°C.

#### 5.7 Estabilidade térmica:

A estabilidade térmica da tripsina isolada é maior a 30°C e diminui cada vez que mantida sob uma temperatura maior antes do teste da atividade residual. A enzima perde 53,77% de sua atividade residual aumentando a temperatura de incubação para 40°C e 66,71% quando aumentada para a temperatura ótima. Em 60°C a atividade residual vai à zero.

Gráfico 3. Curva de atividade residual da tripsina após sua exposição à diferentes temperaturas. Foi considerado 100% de atividade aquela que apresentou a maior temperatura no experimento, que foi a atividade residual correspondente à permanência da enzima em 30°C.



Fonte: Elaborado pelo autor

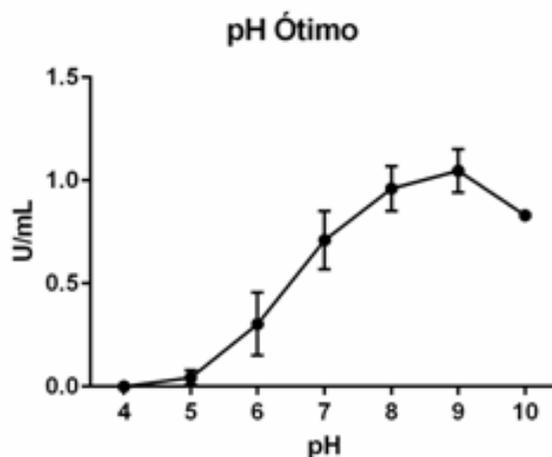
A tripsina isolada nesse estudo apresenta baixa termoestabilidade, variando a conservação da atividade em uma mesma temperatura. As tripsinas podem manter a maior parte de sua atividade residual quando em sua temperatura ótima, mas enquanto a temperatura ótima dessas enzimas se encontra em uma faixa geral de 35-65°C, as tripsinas de peixe, particularmente, são mais susceptíveis à inativação por calor (ASGEIRSSON; FOX; BJARNASON, 1989; SIMPSON; HAARD, 1987). Enzimas podem apresentar instabilidade mesmo em sua temperatura ótima, uma das tripsinas isoladas por Khaled et al. (2011) apresentou atividade residual de 41% em sua temperatura ótima, que também foi de 50°C. Elhadj-Ali et al. (2010) isolou uma tripsina que apresentou atividade residual de 14,45% a 50°C, sua temperatura ótima. Entretanto, já foram encontradas tripsinas que conservam mais de 70% de sua atividade residual a 50°C (KOMKLAO et al., 2009; BOUGATEF et al., 2010). Enzimas susceptíveis à inativação térmica são empregadas em processamento de alimentos de origem animal à baixas temperaturas (BOUGATEF, 2013).

### 5.8 pH Ótimo:

A curva de pH ótimo foi montada com as atividades de 7 pHs distintos, como pode ser visto a seguir:

Gráfico 4. Curva de teste de pH ótimo da tripsina do *S. brasiliensis*. A enzima apresentou capacidade de hidrólise do BapNa no intervalo que compreende os pHs de 6 a 10, sendo o ponto de máxima

atividade o pH=9,0. Não foram feitos testes de atividade para os pHs acima de 10 pela limitação de uso do substrato cromogênico.



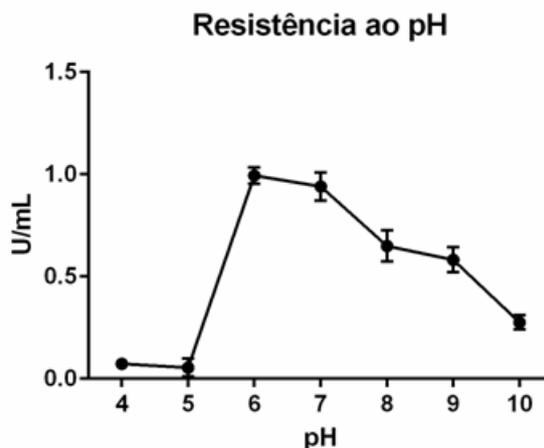
Fonte: Elaborado pelo autor

A enzima mostra atividade significativa quando na presença dos pHs de 6 a 10, havendo aumento da atividade enzimática do pH 4 ao 9, neste último exibindo sua maior atividade. No pH 10, a atividade persiste, porém entra em declínio. As tripsinas em geral apresentam-se como enzimas alcalinas, principalmente as de peixes, que são menos resistentes a pHs mais ácidos do que as tripsinas de mamíferos (SIMPSOM, 2000). As tripsinas que exibem alta atividade em meio alcalino são comumente usadas em formulações de detergentes comerciais, sendo a maior parte da utilização de proteases alcalinas, principalmente subtilisina e tripsina (BOUGATEF, 2013).

#### 5.9 Resistência ao pH:

O teste de estabilidade em diferentes pH resultou no seguinte gráfico:

Gráfico 5. Curva referente à estabilidade da tripsina em diferentes pHs. A atividade residual da tripsina em seu pH ótimo é de 58,59%. Já o ponto de maior estabilidade da enzima é o pH=6 que foi considerado 100%.



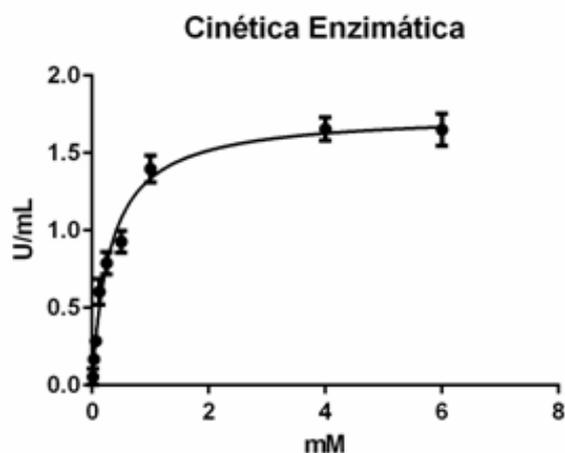
Fonte: Elaborado pelo autor

A tripsina do *S. brasiliensis* apresentou conservação da atividade na região de pH que vai de 6 a 10, de forma que sua atividade residual em pH ótimo é significativa, 58,59% aproximadamente. A tripsina isolada neste trabalho apresentou uma faixa de resistência ao pH semelhante ao de outros trabalhos, que frequentemente se localiza no intervalo entre 6 e 12 unidades de pH (SILA et al., 2012; KHALED et al., 2011; BOUGATEF et al. 2010; BARKIA et al., 2010; KOMKLAO et al., 2009; ELHADJI-ALI et al., 2010). A tripsina conserva atividade até o pH 10 e por causa da suscetibilidade do BapNa sofrer hidrólise total em pHs mais básicos, não foi possível testar a atividade em pHs maiores que 10. Entretanto, sua atividade residual é maior em pH=6 do que em região básica de pH, o que torna a viabilidade para aplicação em formulas de detergentes discutível.

#### 5.10 Cinética enzimática:

Foram obtidos os valores de  $K_m$  e  $V_{max}$  com as reações da tripsina isolada, bem como o gráfico da cinética da enzima:

Gráfico 6. Curva de cinética enzimática da tripsina do *S. brasiliensis*. A enzima apresentou  $K_m=0,3148$  mM.



Fonte: Elaborado pelo autor

Sendo a constante de Michaelis-Menten a metade da concentração de substrato com que a enzima chega à sua velocidade máxima, quanto menor a concentração do substrato testado, mais rápida a reação de catálise do mesmo. O  $K_m$ , entretanto, é determinado para o substrato sendo testado, assim, cada substrato apresenta para a mesma enzima  $K_m$ s diferentes. Abaixo há uma tabela com diferentes valores de  $K_m$  para enzimas testadas com o BapNa como substrato.

Tabela 3. Tabela contendo diferentes valores de  $K_m$  encontrados em diferentes trabalhos de isolamento de tripsinas.

$K_m$ (mM)	Espécie	Referências
0,315	<i>S. brasiliensis</i>	Presente estudo
0,517	<i>L. alexandri</i>	Santos et al. (2016)
0,13	<i>P. disjunctivus</i>	Villalba-Villalba et al. (2013)
0,6	<i>B. callensis</i>	Sila et al. (2012)
0,6	<i>S. basilisca</i>	Ktari et al. (2012)
1,67	<i>S. aurita</i>	Khaled et al. (2011)
0,13	<i>B. boops</i>	Barkia et al. (2010)
0,507	<i>L. vita</i>	Khantaphant; Benjakul (2010)
0,068	<i>B. capriscus</i>	Jellouli et al. (2009)
0,29	<i>L. mormyrus</i>	Elhadj-Ali et al. (2010)
0,049	<i>E. japônica</i>	Heu; Kim; Pyeun (1995)
0,077	<i>G. Mohrua</i>	Asgeirsson; Fox; Bjarnason (1989)

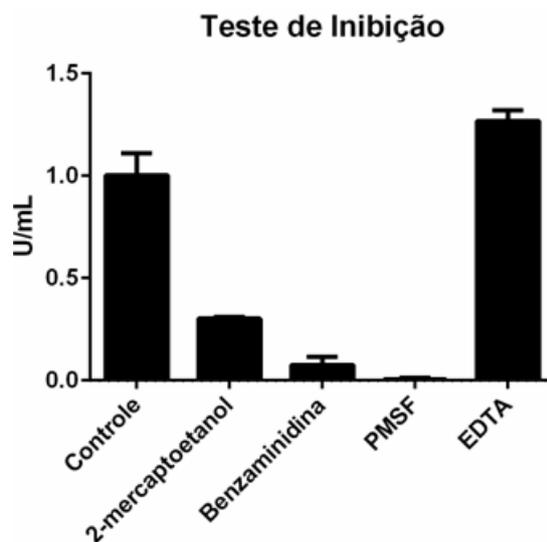
Fonte: Elaborada pelo autor

O Km da tripsina isolada nesse trabalho é próximo ao encontrado no trabalho de Elhadj-Ali et al. (2010) e é bem menor que o Km encontrado no trabalho de Khaled et al. (2011). Por outro lado é consideravelmente menor ao que foi encontrado para a tripsina de Heu; Kim; Pyeun (1995).

### 5.11 Inibição Enzimática:

A tripsina purificada do *S. brasiliensis* teve sua atividade testada contra quatro inibidores diferentes, como pode ser visto na figura a seguir:

Gráfico 7. Testes de inibição de atividade da tripsina. Cada coluna corresponde à atividade residual da tripsina quando exposta a diferentes inibidores, todos em concentração de reação de 8 mM.



Fonte: Elaborado pelo autor

O 2-mercaptoetanol é um inibidor de cisteína proteases, outro tipo de protease que não o das tripsinas, que são serinas proteases. Essa molécula apresentou inibição expressiva da tripsina (69,88%), muito provavelmente por que a concentração de reação foi muito alta. Mas o 2-mercaptoetanol pode alterar a atividade da tripsina pela sua capacidade de interagir com os grupos sulfidril da enzima. Entretanto, a benzamimidina mostrou inibição de 92,4% da atividade da enzima, algo que é esperado para uma serina protease, sendo a benzamimidina um inibidor competitivo reversível de serinas proteases, mostrou maior poder de inibição

que o 2-mercaptoetanol. Já o PMSF, que é um inibidor competitivo irreversível da enzima inibiu aproximadamente 99,99%, o que também é esperado para uma serina protease como a tripsina. Já foi documentada pequena inibição de tripsina por remoção de  $\text{Ca}^{+2}$  causada pela presença do EDTA, mas o aumento de 20% acima do controle não é esperado. Alguns metais exibem poder inibitório como o  $\text{Hg}^{+2}$  e o  $\text{Co}^{+2}$ , e sua retirada da enzima pode em teoria aumentar sua atividade, o que seria indicativo de contaminação dos espécimes pela presença de algum desses metais em seu ambiente. A ação do cálcio sobre grupos carregados da molécula podem de alguma forma estar alterando o acesso ao sítio catalítico de forma a diminuir a atividade da enzima (SIPOS; MERKELT, 1970). Talvez o cálcio aumente a estabilidade da tripsina do *S. brasiliensis* também diminuindo sua atividade. O EDTA é inibidor de metaloproteinases, portanto não sendo um inibidor eficiente para as serina proteases.

## 6 CONCLUSÕES:

É possível afirmar que o Serra, além de ser uma espécie importante economicamente para as populações tradicionais de Maceió, que se alimentam e comercializam o animal, é um peixe produtor de biomoléculas importantes para a indústria. As vísceras do animal que seriam descartadas podem sofrer processamento a fim de obter moléculas que podem ser aplicadas de diversas formas na indústria, o que diminui o desperdício e a poluição. Foi possível isolar a enzima com apenas um passo cromatográfico, que é importante não apenas pela viabilidade econômica da rota de isolamento proposta, mas também para que a recuperação da enzima não continue diminuindo. É possível afirmar que o caminho delineado para o isolamento é viável economicamente para uso industrial, e dependendo da aplicação, não é necessária que a enzima esteja pura. O trabalho aqui descrito mostra ser possível extrair tripsinas dos cecos pilóricos do serra e também sugere que possa ser possível extrair tripsinas do intestino desse animal.

Também há a possibilidade de que haja mais uma isoforma produzida pelo próprio ceco pilórico na fração 40-60% da precipitação com sulfato de amônio. Entretanto, para confirmar a existência de uma isoforma da enzima nessa fração, é necessário trabalhar no isolamento da mesma. Depois de realizada a purificação dessa enzima, foi feita a caracterização, onde foi possível identificar o pH=9,0 e a temperatura ótima 50°C, bem como qual região de pH e temperaturas em que ela é estável. É uma enzima que não é tão estável quanto ao aumento de temperatura e conserva pouco menos da metade da atividade residual em seu pH ótimo.

Tripsinas com baixa resistência térmica são muito usadas em processamento de frios e congelados. Ainda não é possível afirmar se a enzima pode ser usada em uma aplicação específica e para isso é necessário fazer experimentos direcionados a aplicações biológicas para mostrar capacidade de uso científico, industrial ou médico. A principal perspectiva do presente estudo é encontrar uma ou mais aplicações para a tripsina isolada.

## 7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS:

AHSAN, M.N.; WATABE, S. Kinetic and structural properties of two isoforms of trypsin isolated from the viscera of Japanese anchovy, *Engraulis japonicus*. **Journal of protein chemistry**, v. 20, n. 1, p. 49-58, 2001.

ALVES, A.P.N.N. et al. Avaliação microscópica, estudo histoquímico e análise de propriedades tensiométricas da pele de tilápia do Nilo. **Rev Bras Queimaduras**, v. 14, n. 3, p. 203-10, 2015

ANWAR, A.; SALEEMUDDIN, M. Alkaline proteases: a review. **Bioresource technology**, v. 64, n. 3, p. 175-183, 1998.

ARAÚJO, A.S.; CHELLAPPA, S. Estratégia reprodutiva do peixe voador. **Hirundichthys affinis**, p. 691-702, 2002.

ÁGEIRSSON, B.; FOX, J.W.; BJARNASON, J.B. Purification and characterization of trypsin from the poikilotherm *Gadus morhua*. **The FEBS Journal**, v. 180, n. 1, p. 85-94, 1989.

BANIK, R.M.; PRAKASH, M. Laundry detergent compatibility of the alkaline protease from *Bacillus cereus*. **Microbiological Research**, v. 159, n. 2, p. 135-140, 2004.

BARKIA, A. et al. Trypsin from the viscera of Bogue (Boops boops): isolation and characterisation. **Fish physiology and biochemistry**, v. 36, n. 4, p. 893-902, 2010.

BERG, J.M.; TYMOCZO, J.L.; STRYER, L.; Campos J.P. (rev. tec. e trad.); Moreira, A.J.M.S.; Motta, A.P. (trad.). **Bioquímica**. 6° ed., Rio de Janeiro, Guanabara Koogan, 2012; 1114 f.

BEZERRA, R.S. et al. Characterization of stomach and pyloric caeca proteinases of tambaqui (*Colossoma macropomum*). **Journal of food biochemistry**, v. 24, n. 3, p. 189-199, 2000.

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

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

BODE, W.; SCHWAGER, P. The refined crystal structure of bovine  $\beta$ -trypsin at 1-8 Å resolution, crystallographic refinement, calcium binding site, benzamidine binding site and active site at pH 7,0. **Molecular Biology Journal**, n. 98, p. 693-717, 1975.

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

BOUGATEF, A. et al. Biochemical properties of anionic trypsin acting at high concentration of NaCl purified from the intestine of a carnivorous fish: smooth hound (*Mustelus mustelus*). **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 58, n. 9, p. 5763-5769, 2010.

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

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

CASTILLO-YÁNEZ, F.J. et al. Isolation and characterization of trypsin from pyloric caeca of Monterey sardine *Sardinops sagax caerulea*. **Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology**, v. 140, n. 1, p. 91-98, 2005.

CHELLAPPA, S. et al. Ovarian development and spawning of Serra Spanish mackerel in coastal waters of Northeastern Brazil. **Brazilian Journal of Biology**, v. 70, n. 2, p. 451-456, 2010.

COLLETTE, B.B.; RUSSO, J.L.; ZAVALA-CAMIN, L.A. *Scomberomorus brasiliensis*, a new species of Spanish mackerel from the western Atlantic. **Fishery Bulletin**, v. 76, n. 1, p. 273-280, 1978.

COLLETTE, B.B. et al. **FAO species catalogue. Volume 2. Scombrids of the world. An annotated and illustrated catalogue of tunas, mackerels, bonitos and related species known to date.** 1983.

COSTA, B.G.; LACERDA, L.D. Concentração de mercúrio total em Cavala, *Scomberomorus cavalla*, e Serra, *Scomberomorus brasiliensis*, comercializadas nas bancas de pescado do Mucuripe, Fortaleza, Ceará. **Arquivos de Ciências do Mar**, v. 42, n. 1, p. 22-29, 2009.

COSTA, H.M.S. et al. Metal-sensitive and thermostable trypsin from the crevalle jack (*Caranx hippos*) pyloric caeca: purification and characterization. **Chemistry Central Journal**, n. 7, p. 166-173, 2013.

DEVLIN, T.M. **Manual de bioquímica com correlações clínicas.** 7° ed. Edgard Blucher, 2011. 1252p.

EIRAS, J.C. et al. A note on the infection of *Scomberomorus brasiliensis* (Osteichthyes, Scombridae) by *Kudoa* sp. (Myxozoa: Multivalvulida). **Brazilian Journal of Biology**, v. 74, n. 3, p. S164-S166, 2014.

ELHADJ ALI, N. et al. Alkaline chymotrypsin from striped seabream (*Lithognathus mormyrus*) viscera: purification and characterization. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 58, n. 17, p. 9787-9792, 2010.

ESPÓSITO, T.S. et al. Fish processing waste as a source of alkaline proteases for laundry detergent. **Food Chemistry Journal**, n.112, p. 125-130, 2009.

FAO. 2016. El estado mundial de la pesca y la acuicultura 2016. Contribución a la seguridad alimentaria y la nutrición para todos. Roma. 224 pp.

FONG, W.-P.; CHAN, E.Y.-M.; LAU, K.-K. Isolation of two chymotrypsins from grass carp. **IUBMB Life**, v. 45, n. 2, p. 409-418, 1998.

FREITAS-JÚNIOR, A.C.V. et al. Giant Amazonian fish pirarucu (*Arapaima gigas*): its viscera as a source of thermostable trypsin. **Food Chemistry Journal**, n. 133, p. 1596-1602, 2012.

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

GUPTA, R. et al. Bleach-stable, alkaline protease from *Bacillus* sp. **Biotechnology Letters**, v. 21, n. 2, p. 135-138, 1999.

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

HAARD, N.F. A review of proteolytic enzymes from marine organisms and their application in the food industry. **Journal of Aquatic Food Product Technology**, v. 1, n. 1, p. 17-35, 1992.

HAARD, N.F. Specialty enzymes from marine organisms. **Food Technology**, v. 52, n. 7, p. 64-67, 1998.

HEDSTROM, L. Serine Protease Mechanism and Specificity. **Chemical Reviews**, vol. 102, n. 12, p. 4501-4523, 2002.

HEU, M.S.; KIM, H.R.; PYEUN, J.H. Comparison of trypsin and chymotrypsin from the viscera of anchovy, *Engraulis japonica*. **Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology**, v. 112, n. 3, p. 557-567, 1995.

HINTERWIRTH, H.; LINDNER, W.; LÄMMERHOFER, M. Bioconjugation of trypsin onto gold nanoparticles: effect of surface chemistry on bioactivity. **Analytica chimica acta**, v. 733, p. 90-97, 2012.

JELLOUKI, K. et al. New alkaline trypsin from the intestine of grey triggerfish (*Balistes capriscus*) with high activity at low temperature: purification and characterization. **Food Chemistry Journal**, n. 116, p. 644-650, 2009.

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

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

KHALED, H.B. et al. Purification and characterization of three trypsin isoforms from viscera of sardinelle (*Sardinella aurita*). **Fish Physiology and Biochemistry Journal**, n. 37, p. 123-133, 2011.

KHANGENBAM, K.K.; YVR, K.S.; CHAKRABATI, R. Purification and characterization of trypsin from the digestive system of carp *catla catla* (Hamilton). **International Aquatic Research Journal**, n. 4, p. 9-20, 2012.

KIM, H.R. et al. Enzymatic properties of anionic trypsins from the hepatopancreas of crayfish, *Procambarus clarkia*. **Comp. Biochem. Physiol.**, v. 107B, n. 2 p., 197-203, 1994.

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

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

KISHIMURA, H. et al. Characteristics of trypsins from the viscera of true sardine (*Sardinops melanostictus*) and the pyloric ceca of arabesque greenling (*Pleuroprammus azonus*). **Food Chemistry**, v. 97, n. 1, p. 65-70, 2006.

KISHIMURA, H. et al. Comparative study on thermal stability of trypsin from the pyloric ceca of threadfin hakeling (*Laemonema longipes*). **Journal of food biochemistry**, v. 34, n. 1, p. 50-65, 2010.

KISHIMURA, H. et al. Trypsins from the pyloric ceca of jacobever (*Sebastes schlegelii*) and elkhorn sculpin (*Alcichthys alcicornis*): isolation and characterization. **Food Chemistry**, v. 100, n. 4, p. 1490-1495, 2007.

KLOMKLAO, S.; BENJAKUL, S.; VISSANGUAN, W. Comparative studies on proteolytic activity of splenic extract from three tuna species commonly used in Thailand. **Journal of Food Biochemistry**, n. 28, p. 355-372., 2004.

KLOMKLAO, S. et al. Partitioning and recovery of proteinase from tuna spleen by aqueous two-phase systems. **Process Biochemistry**, v. 40, n. 9, p. 3061-3067, 2005.

KLOMKLAO, S. et al. Trypsins from yellowfin tuna (*Thunnus albacores*) spleen: purification and characterization. **Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology**, v. 144, n. 1, p. 47-56, 2006.

KLOMKLAO, S. et al. Cationic trypsin: A predominant proteinase in Pacific saury (*Cololabis saira*) pyloric ceca. **Journal of food biochemistry**, v. 34, n. 5, p. 1105-1123, 2010.

KOSSIANKOFF, A.A. et al. Structure of bovine trypsinogen at 1.9 Å resolution. **Biochemistry**, v. 16, n. 4, p. 654-664, 1977.

KRISTJANSSON, M.M. Purification and characterization of trypsin from the pyloric caeca of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 39, n. 10, p. 1738-1742, 1991.

KTARI, N. et al. Trypsin from zebra blenny (*Salaria basilisca*) viscera: purification, characterization and potential application as a detergent additive. **Food Chemistry Journal**, n. 130, p. 467-474, 2012.

KUMAR, C.G.; TAKAGI, H. Microbial alkaline proteases: from a bioindustrial viewpoint. **Biotechnology advances**, v. 17, n. 7, p. 561-594, 1999.

KURTOVIC, I.; MARSHALL, S.N.; SIMPSON, B.K. Isolation and characterization of a trypsin fraction from the pyloric caeca of chinook salmon (*Oncorhynchus tshawytscha*). **Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology**, v. 143, n. 4, p. 432-440, 2006.

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

LI, R.; LIRIANO, L. A bone sample cleaning method using trypsin for the isolation of DNA. **Legal Medicine**, v. 13, n. 6, p. 304-308, 2011.

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

LUCENA, F. et al. ASPECTOS BIOLÓGICO-PESQUEIROS DA SERRA, *Scomberomus brasiliensis*, CAPTURADA COM REDE-DE-ESPERA NO NORDESTE DO BRASIL. **Arquivos de Ciências do Mar**, v. 37, n. 1-2, p. 93-104, 2004.

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

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

NELSON, D.L.; COX, M.M. **Princípios de Bioquímica de Lehninger**. 6° ed. Porto Alegre, Artmed, 2015; 1302 f.

**Projeto de desenvolvimento sustentável da pesca e da aquicultura ambiental**, Governo de Alagoas, Novembro de 2008. 269p.

QUINTAS, J.S., (Org) 2006. Pensando e praticando a educação ambiental na gestão do meio ambiente, Brasília, Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis (IBAMA)

RYPNEWSKI, W.R. et al. Evolutionary divergence and conservation of trypsin. **Protein Engineering Journal**, vol.7, n. 1, p. 57-64, 1994.

ROACH, J.C. et al. The Molecular Evolution of the Vertebrate Trypsinogens. **Journal of Molecular Evolution**, n. 45, p. 640-652, 1997.

SANTOS, C.W.V. et al. Purification and characterization of trypsin from *Luphiosilurus alexandri* pyloric cecum. **Biochemistry and Biophysics Reports**, v. 8, p. 29-33, 2016.

SHAHIDI, F.; KAMIL, Y.J. Enzymes from fish and aquatic invertebrates and their application in the food industry. **Trends in Food Science & Technology**, v. 12, n. 12, p. 435-464, 2001.

SHELTON, C. 2014. Climate change adaptation in fisheries and aquaculture – compilation of initial examples. FAO Fisheries and Aquaculture Circular No. 1088. Rome, FAO. 34 pp.

SHI, C.; MARSHALL, S.N.; SIMPSON, B.K. Purification and characterization of trypsin from the pyloric caeca of the New Zealand Hoki Fish (*Macruronus Novaezealandiae*). **Journal of Food Biochemistry**, n. 31, p. 772-796, 2007.

SILA, A. et al. Characterisation of trypsin purified from the viscera of Tunisian barbel (*Barbus callensis*) and its application for recovery of carotenoproteins from shrimp wastes. **Food Chemistry Journal**, n. 132, p. 1287-1295, 2012.

SILVA, C.M.L. Contribuição à conservação e manejo do peixe-serra (*Scomberomorus brasiliensis* (Osteichthyes; Scombridae) no litoral maranhense. São Luís. 2005. 65 f. Monografia (Especialização em Educação Ambiental) UEMA. **São Luís**.

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

SIMPSON, B.K.; HAARD, N.F. Cold-adapted enzymes from fish. 1987.

SIMPSON, B.K. Digestive proteinases from marine animals. **FOOD SCIENCE AND TECHNOLOGY-NEW YORK-MARCEL DEKKER-**, p. 191-214, 2000.

SIPOS, T.; MERKELT, R.M. An effect of calcium ions on the activity, heat stability, and structure of trypsin. **Biochemistry Journal**, vol. 9, n.14, p. 1766-1775, 1970.

SOUZA, A.A.G. et al. Trypsin-like enzyme from intestine and pyloric caeca of spotted goatfish (*Pseudupeneus maculatus*). **Food Chemistry**, v. 100, n. 4, p. 1429-1434, 2007.

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

SUZUKI, C.R. **Guia de peixes do litoral brasileiro**. Book's Edições, 1983.

TURK, B. Targeting proteases: successes, failures and future prospects. **Nature Reviews: drug discovery**, vol.5, p. 785-799, sep. 2006.

VILLALBA-VILLALBA, A.G. et al. Partial characterization of alkaline proteases from viscera of vermiculated sailfin catfish *Pterygoplichthys disjunctivus* Weber, 1991. **Fisheries Science**, v. 77, n. 4, p. 697-705, 2011.

VILLALBA-VILLALBA A.G. Trypsin from viscera of vermiculated sailfin catfish, *Pterygoplichthys disjunctivus*, Weber, 1991: its purification and characterization. **Food Chemistry Journal**, n. 141, p. 940-945, 2013.

YANG, Y. et al. Serine proteases of parasitic helminths. **The Korean journal of parasitology**, v. 53, n. 1, p. 1, 2015.

ZUKOWSKI, M.M. Production of commercially valuable products. **Biotechnology (USA)**, 1992.

<<https://www.embrapa.br>>.