



**UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA**  
**CENTRO DE CIÊNCIAS EXATAS E DA NATUREZA**  
**DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA MOLECULAR**  
**PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR**

**JOSÉ ALÉCIO FERREIRA DA SILVA**

**AVALIAÇÃO DO POTENCIAL USO DO ESTÔMAGO DO PEIXE XARÉU *Caranx*  
*hippos* (Linnaeus, 1766) COMO FONTE DE PROTEASES ÁCIDAS PARA  
APLICAÇÕES INDUSTRIAIS E BIOTECNOLÓGICAS**

João Pessoa – PB  
2020

JOSÉ ALÉCIO FERREIRA DA SILVA

**AVALIAÇÃO DO POTENCIAL USO DO ESTÔMAGO DO PEIXE XARÉU *Caranx hippos* (Linnaeus, 1766) COMO FONTE DE PROTEASES ÁCIDAS PARA APLICAÇÕES INDUSTRIAIS E BIOTECNOLÓGICAS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular do Centro de Ciências Exatas e da Natureza, da Universidade Federal da Paraíba, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Biologia Celular e Molecular.

**Orientador:** Prof. Dr. Augusto César Vasconcelos de Freitas Júnior

João Pessoa – PB  
2020

**Catálogo na publicação**  
**Seção de Catalogação e Classificação**

S586a Silva, José Alécio Ferreira da.

Avaliação do potencial uso do estômago do peixe xaréu *Caranx hippos* (Linnaeus, 1766) como fonte de proteases ácidas para aplicações industriais e biotecnológicas / José Alécio Ferreira da Silva. - João Pessoa, 2020.  
37 f. : il.

Orientação: Augusto César Vasconcelos de Freitas Júnior.

Dissertação (Mestrado) - UFPB/CCEN.

1. Biologia celular e molecular. 2. Aproveitamento de resíduos. 3. Enzimas de peixes. 4. Proteases digestórias. 5. Proteases ácidas. I. Freitas Júnior, Augusto César Vasconcelos de. II. Título.

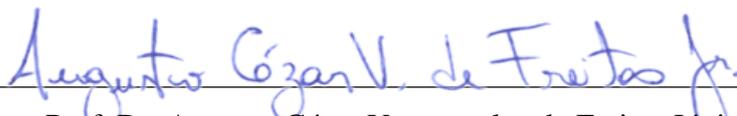
UFPB/BC

CDU 576+577.2(043)

JOSÉ ALÉCIO FERREIRA DA SILVA

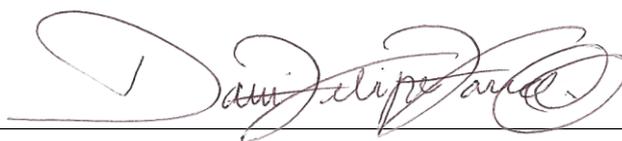
Dissertação de Mestrado avaliada em 28/02/2020

BANCA EXAMINADORA



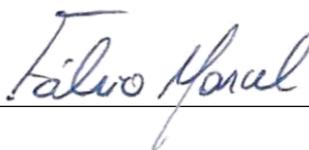
Prof. Dr. Augusto César Vasconcelos de Freitas Júnior

Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular da Universidade Federal  
da Paraíba  
(Orientador)



Prof. Dr. Davi Felipe Farias

Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular da Universidade Federal  
da Paraíba  
(Examinador Interno)



Prof. Dr. Fábio Marcel da Silva Santos

Departamento de Fisiologia e Patologia do Centro de Ciências da Saúde da  
Universidade Federal da Paraíba  
(Examinador Externo)

*À minha mãe, que, em todos os momentos, foi a maior fonte da minha força.*

## AGRADECIMENTOS

À minha mãe, a Senhora Maria Amável Mendonça da Silva (*in memoriam*), que sempre foi minha maior referência em caráter, altruísmo e fé. Ao meu pai, José Ferreira, um exemplo de trabalho e determinação. Ao meu irmão, José Ferreira Filho, primeiro e maior amigo desde a infância, maior parceiro de trabalho na nossa empresa e exemplo de dedicação incondicional ao que faz para ganhar o sustento.

Às minhas irmãs, Amália, Cássia e Lidiane pelo carinho absoluto e amor sempre presente e recíproco.

À minha companheira de longa data, Thaisa Juliany da Silva, sempre dormindo tarde e acordando cedo, juntos, em nossa luta diária, porém revigorante por ser tão gratificante e próspera, pelo seu amor.

Um agradecimento especial ao Professor Dr. Augusto César V. de Freitas Júnior, meu orientador, que sempre se apresentou muito solícito e dedicado para com seu trabalho e alunos.

À professora Dra. Helane Maria Silva da Costa, que acolheu com muita dedicação todos do laboratório BIOAQUA, orientando e contribuindo com sua experiência e conhecimentos, sempre com muita paciência.

Ao Professor Dr. Eleônidas Moura Lima, por sempre lutar pelas melhorias dos laboratórios e equipamentos, bem como pelo bem-estar dos alunos do programa.

Ao técnico de laboratório e amigo, senhor Antônio Bosco Carlos, que sempre ofereceu grande ajuda nas nossas atividades do laboratório.

Agradeço à família de pescadores e donos da Peixaria Shalom, o patriarca Francisco Assis de Melo e os seus filhos e filha, Luiz Carlos Breno de Melo, Jeferson Cavalcante de Melo, Alisson Fernando de Melo, Cícero Almeida dos Santos e Fernanda Cavalcante de Melo, que forneceram ajuda imprescindível para a aquisição do material biológico para o trabalho.

Ao meu amigo de estudos, Joálison Moreira da Silva, às minhas colegas de laboratório, Mariany Karla dos Santos Silva e Thalia Andrade Silva, sempre contribuindo muito para o desenvolvimento dos trabalhos, de forma muito cortês e altruísta, em muito tenho a agradecer as duas por tudo que contribuíram durante todo o período do mestrado. E, também, à Ana Beatriz Rodrigues dos Santos, Maria Luiza Emílio Leal e a Lucas Donizet Araújo Costa, que muito contribuíram na pesquisa e nas melhorias no laboratório, bem como por suas amizades.

*Sou muito grato às adversidades que apareceram na minha vida, pois elas me ensinaram a tolerância, a simpatia, o autocontrole, a perseverança e outras qualidades que, sem essas adversidades, eu jamais conheceria.*

Napoleon Hill

## RESUMO

Nas últimas décadas, se constatou um crescimento constante no consumo de pescado, principalmente em função do aumento da população e demanda de alimentos mais saudáveis. Este crescimento também traz desafios sobre o gerenciamento dos resíduos gerados no processamento desse pescado. Os resíduos sólidos, como escamas, nadadeiras e vísceras são geralmente descartados *in natura* causando ônus ambiental. Uma das espécies mais pescadas no litoral nordestino é o *Caranx hippos*, popularmente conhecido como xaréu ou xaréu-cabeçudo. Desta forma, este trabalho objetivou avaliar o potencial uso do estômago do xaréu (*Caranx hippos*) como fonte de proteases aspárticas de interesse industrial e biotecnológico. Para isso, foi preparado um homogenato a partir do estômago. O homogenato foi submetido a um processo de acidificação e “*salting-out*”, e uma fração proteica (F60) foi coletada. Utilizando F60 foram realizados ensaios de atividade proteolítica ácida específica, caracterização físico-química, zimograma e efeito de agentes químicos. A partir do estômago foi possível obter uma fração enzimática com purificação de 1,6 vezes e um rendimento de 49,4%. A atividade proteolítica específica da fração obtida foi de  $1.404,6 \pm 3,09$  U/mg. A temperatura ótima para a atividade proteolítica foi de 50°C e a estabilidade térmica foi observada entre 25°C e 50°C. Uma faixa de pH ótimo entre o pH 1,5 até 3,5 e uma faixa de estabilidade ao pH de 1,5 a 7,0 foram observadas para a atividade proteolítica de F60%. Foi observada a inibição total da atividade enzimática na presença de pepstatina A, e uma baixa inibição na presença de metais pesados. Através do zimograma foi possível observar a presença de duas bandas proteolíticas. F60 manteve mais de 50% de sua atividade proteolítica na presença de 15% de NaCl. Através dos dados obtidos pode-se concluir que o estômago do peixe *C. hippos* é uma promissora fonte alternativa de proteases aspárticas com características de interesse industrial e biotecnológico.

**Palavras-Chave:** Aproveitamento de resíduos, Enzimas de peixes, Proteases digestórias, Proteases ácidas.

## ABSTRACT

Over the past few decades there has been a growing at fish consumption, mainly due to the population growth as well as higher demand for healthy food. This growth brings challenges about the management of waste generated in the processing of this fish. Solid residues such as scales, fins and viscera are generally discarded *in natura* causing an environmental damage. One of the most captured fish species in Brazilian Northeastern coast is the *Caranx hippos*, popularly known as crevale jack. In this way, this work aimed to evaluate the potential use of the *C. hippos* stomach as a source of aspartic proteases for industrial and biotechnological applications. For this, a homogenate was obtained from the stomach. The homogenate was submitted to an acidification and "salting-out" process, and a protein fraction (F60) was collected. Using F60, tests were performed for specific acid proteolytic activity, physical-chemical characterization, zymogram and chemical agents effects. From the stomach it was possible to obtain an enzymatic fraction with a purification rate of 1.6 folds and a 49.4% of yield. The F60 specific proteolytic activity observed was  $1,404.6 \pm 3.09$  U/mg. The optimum temperature for proteolytic activity was 50 °C and the thermal stability was observed between 25 °C and 50 °C. For F60 proteolytic activity were observed an optimal pH and pH stability ranges between pH 1.5 to 3.5 and pH 1.5 to 7.0, respectively. Were observed a total inhibition of enzymatic activity in the presence of pepstatin A, and a low inhibition in the presence of heavy metals. Through the zymogram it was possible to observe the presence of two proteolytic bands. F60 maintained more than 50% of its proteolytic activity in the presence of NaCl 15%. Through the obtained data it is possible to reach that the stomach of the fish *C. hippos* is a promising alternative source of aspartic proteases with interesting characteristics for industrial and biotechnological applications.

**Keywords:** Acidic proteases, By-product recovery, Digestive proteases, Fish Enzymes.

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

Al<sup>3+</sup>: Alumínio

BSA: Albumina de Soro Bovino

Ca<sup>2+</sup>: Cálcio

Cd<sup>2+</sup>: Cádmió

Cu<sup>2+</sup>: Cobre

DTT: Ditiotreitól

EB: Extrato Bruto

FAO: Organização das Nações Unidas para a Alimentação e a Agricultura

Fe<sup>2+</sup>: Ferro

HCl: Ácido Clorídrico

Hg<sup>2+</sup>: Mercúrio

M: Molar

mg: Miligrama

Mg<sup>2+</sup>: Magnésio

mL: Mililitros

mM: Milimolar

Mn<sup>2+</sup>: Manganês

MPA: Ministério da Pesca e Aquicultura

NaCl: Cloreto de Sódio

nm: Nanômetros

Pb<sup>2+</sup>: Chumbo

pH: potencial Hidrogeniônico

t: Toneladas

U: Unidade

## LISTAS DE FIGURAS

<b>Figura 1</b> – Peixe xaréu ( <i>Caranx hippos</i> ) .....	<b>15</b>
<b>Figura 2</b> – Distribuição geográfica do xaréu ( <i>Caranx hippos</i> ) pelo mundo .....	<b>16</b>
<b>Figura 3</b> – Fluxograma dos resíduos e suas possíveis aplicações tecnológicas .....	<b>18</b>
<b>Figura 4</b> – Temperatura ótima para a atividade proteolítica das proteases ácidas presentes em F60.....	<b>25</b>
<b>Figura 5</b> – Estabilidade térmica das proteases ácidas digestórias presentes em F60.....	<b>26</b>
<b>Figura 6</b> – pH ótimo para a atividade proteolítica das proteases ácidas presentes em F60.....	<b>27</b>
<b>Figura 7</b> – Efeito do pH sobre a estabilidade das proteases ácidas presentes em F60.....	<b>28</b>
<b>Figura 8</b> – Efeito do NaCl sobre a atividade proteolítica de F60.....	<b>32</b>
<b>Figura 9</b> – Zimograma da F60.....	<b>33</b>

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1</b> – Taxonomia do xaréu ( <i>Caranx hippos</i> ).....	<b>16</b>
<b>Tabela 2</b> –Purificação parcial de proteases digestórias ácidas de <i>Caranx hippos</i> .....	<b>24</b>
<b>Tabela 3</b> – Efeito de agentes químicos sobre a atividade proteolítica de F60.....	<b>31</b>

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	15
1.1. Produção e processamento de pescado .....	15
1.2. Aproveitamento de resíduos para obtenção de biomoléculas .....	17
2.1. Objetivo geral .....	20
2.2. Objetivos específicos .....	20
<b>3. MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	21
3.1 Obtenção dos estômagos de xaréu e do extrato bruto (EB) .....	21
3.2. Ensaio de atividade enzimática e dosagem de proteína solúvel .....	21
3.3. Ativação de zimogênios .....	21
3.4. Pré-purificação e concentração das proteases presentes no EB acidificado .....	21
3.5. Caracterização físico-química da atividade proteolítica ácida da fração F60 .....	22
3.6. Efeitos de íons metálicos, agente redutor e inibidor específico .....	22
3.7. Zimograma .....	23
3.8. Efeitos do NaCl .....	23
3.9. Análise estatística .....	23
<b>4. RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	24
4.1. Obtenção das enzimas .....	24
4.2 Efeito da temperatura .....	24
4.3 Efeito do pH .....	27
4.4 Efeito de inibidores e íons metálicos na atividade das proteases ácidas .....	29
4.5. Efeito do NaCl .....	31
4.6 Zimograma .....	32
<b>5. CONCLUSÕES</b> .....	34
<b>6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	35

## 1. INTRODUÇÃO

### 1.1. Produção e processamento de pescado

O pescado é um excelente alimento por conter proteínas muscular com elevado valor nutricional, sendo ricas em aminoácidos essenciais à espécie humana (SGARBIERI, 1999). Nas últimas décadas o consumo de pescado tem aumentado e conseqüentemente sua produção para suprir esta demanda. Segundo a Organização das Nações Unidas para a Alimentação e a Agricultura (FAO, 2018), a produção mundial pesqueira atingirá 195,9 milhões de toneladas em 2025, um incremento de 17,4% em relação à produção média de 2013-2016 (FAO, 2018). No Brasil, os dados da produção pesqueira nacional infelizmente não são atualizados desde 2011. Entretanto, com uma costa litorânea de 8,4 mil km, 5,5 milhões de hectares de reservatórios de água continental e clima favorável, o setor pesqueiro brasileiro se mostra ainda com um futuro próspero.

Dentre as espécies capturadas na costa brasileira, encontra-se o xaréu (*Caranx hippos* Linnaeus, 1776), também conhecido popularmente como xaréu-cabeçudo. Esta espécie pertence a grande família Carangidae (Tabela 1) e apresenta comportamento migratório, pois segue em grandes grupos para o norte a fim de desovar entre novembro e janeiro e depois retorna ao sul. São animais predadores, alimentando-se de peixes menores e alguns invertebrados (LUQUE; ALVES, 2001).

**Figura 1** – Peixe xaréu (*Caranx hippos*)



© 1992, Diane Rome Peebles

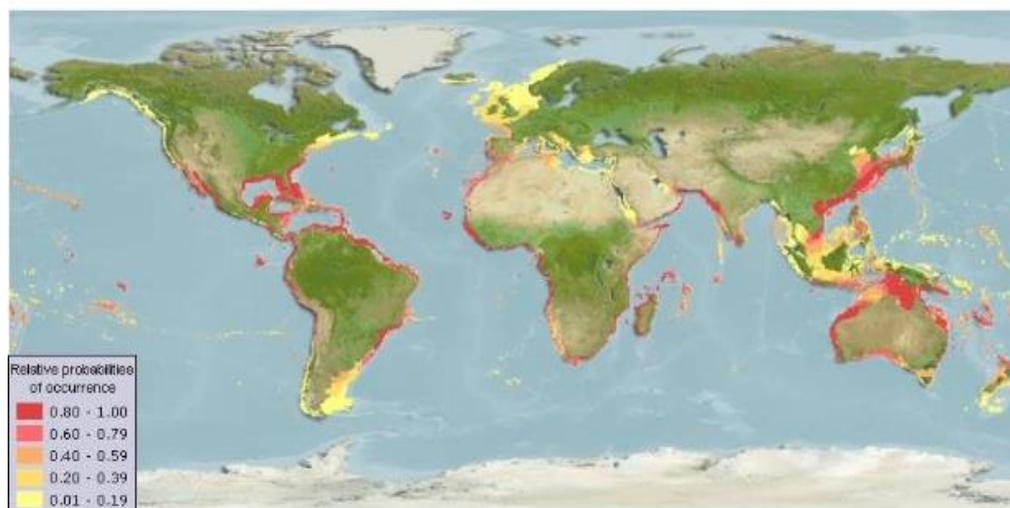
Fonte: [https://igfa.org/SpeciesID/Images/jack\\_crevalle.png](https://igfa.org/SpeciesID/Images/jack_crevalle.png), acesso em: 05/02/2020.

**Tabela 1** – Taxonomia do xaréu (*Caranx hippos*)

Reino	Animalia
Subreino	Bilateria
Infra reino	Deuterostomia
Filo	Chordata
Subfilo	Vertebrados
Infra filo	Gnathostomata
Super classe	Actinopterygii
Classe	Teleostei
Super ordem	Acanthopterygii
Ordem	Perciformes
Sub ordem	Percoidei
Família	Carangidae
Gênero	<i>Caranx</i>
Espécie	<i>Caranx hippos</i>

Fonte: Silva (2020)

O xaréu possui ampla distribuição geográfica, e no continente americano podem ser encontrados em todo Atlântico Ocidental, do Canadá à Argentina, ocorrendo em todo litoral brasileiro, com maiores concentrações nas regiões Norte e Nordeste do Brasil. De acordo com o último boletim da pesca extrativa e aquicultura realizado no Brasil (MPA, 2011) a média da produção nacional de xaréu (*C. hippos*) entre os anos de 2009 a 2011 foi de 2.509,1 t não ocorrendo grande variação na produção anual neste período.

**Figura 2** – Distribuição Geográfica do xaréu (*Caranx hippos*) pelo mundo.

Fonte: Fishbase.se

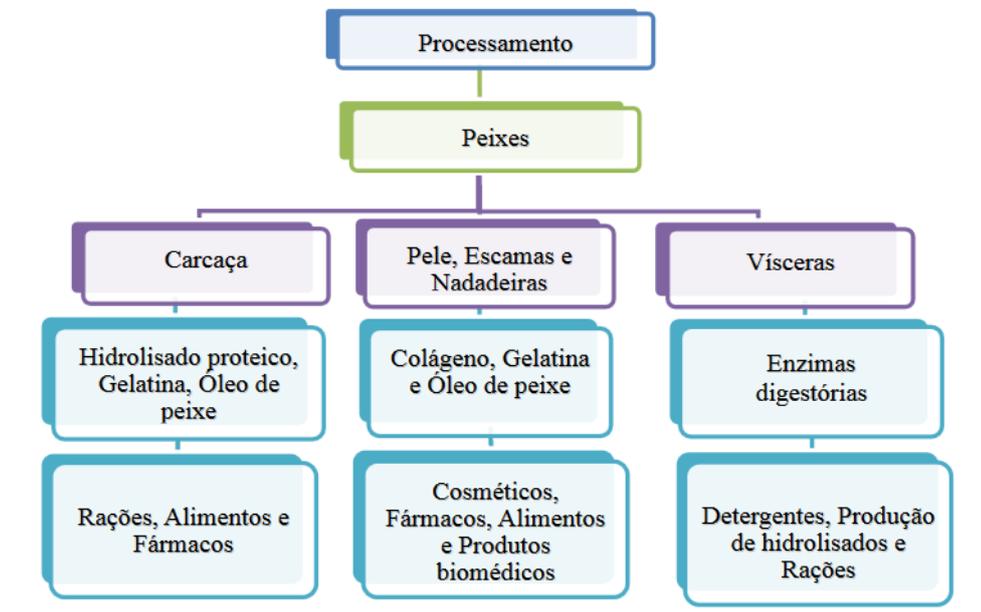
Diante do aumento da produção, o setor do pescado tem um grande desafio a ser enfrentado quanto ao gerenciamento dos resíduos gerados durante a cadeia produtiva, o que constitui parâmetro indicativo da eficiência do sistema (ARRUDA *et al.*, 2007; ROSLAN *et al.*, 2015). O termo “resíduo” é utilizado não apenas para descartes sólidos, mas também para despojos líquidos e gases emitidos para o ar atmosférico. Alguns destes podem apresentar valor econômico agregado pela possibilidade de seu reaproveitamento, sendo 30% deles subutilizados para produção de coprodutos de menor valor econômico, tais como ração animal, fertilizantes e silagem (HE *et al.*, 2013; VILLAMIL *et al.*, 2017).

A maior parte dos resíduos sólidos oriundos do processamento de peixes, como as partes do músculo com alto teor de mioglobina, portanto mais escuras e os resíduos oriundos da filetagem, tais como cabeça, vísceras e carcaça, são em sua maioria descartados, representando sérios problemas de poluição ambiental, além de perdas de matéria prima e energia, pela falta de destino adequado deste material (VIDAL *et al.*, 2011; VILLAMIL *et al.*, 2017). Como exemplo do grande volume de resíduos gerado no processamento, pode-se citar o fato de que, na obtenção do filé de tilápia, cerca de 60 a 70% do peso do animal corresponde a resíduos no fim do processo (SILVA *et al.*, 2014), e este percentual pode variar de acordo com a espécie e a forma de processamento. Esta grande quantidade de resíduos, aliado à falta de descarte adequado, constituem-se em barreiras para a certificação da cadeia produtiva do pescado (ANBE *et al.*, 2015).

## 1.2. Aproveitamento de resíduos para obtenção de biomoléculas

Existe a necessidade crescente da descoberta de fontes alternativas para a obtenção de biomoléculas de alta demanda industrial. Vários estudos mostram diversas maneiras de aproveitamento de resíduos do processamento de peixes (Figura 3), diretamente relacionadas com a quantidade em que são gerados (VILLAMIL *et al.*, 2017), incluindo vários coprodutos de alto valor econômico gerados a partir de resíduos sólidos, como a extração de óleo, minerais, colágeno, gelatina e enzimas, destacando a obtenção de hidrolisados proteicos (PASUPULETI; BRAUN, 2010; HERPANDI *et al.*, 2011).

**Figura 3** – Fluxograma de processamento do pescado, obtenção de resíduos e suas possíveis aplicações tecnológicas



Fonte: Adaptado de Bezerra e Freitas-Júnior (2015)

A obtenção de proteínas de interesse comercial, como enzimas e colágeno, é uma das formas de aproveitar esta biomassa. O colágeno e seu derivado, a gelatina, são amplamente utilizados na indústria de alimentos e farmacêutica. A maior parte do colágeno comercializado tem origem bovina e suína, e enfrenta barreiras religiosas e sanitárias devido à transmissão de zoonoses como a encefalopatia espongiforme bovina (SADOWSKA *et al.*, 2003; SILVA; PENNA, 2012). Pele, nadadeiras e escamas de peixes, já são utilizados em menor escala para obtenção de colágeno e gelatina comercial.

As vísceras de peixes vêm tendo destaque pelo seu comprovado potencial como fonte de proteases digestórias, ácidas e alcalinas, de interesse industrial (ESPOSITO *et al.*, 2010; NALINANON *et al.*, 2010; FREITAS-JÚNIOR, *et al.* 2010; COSTA *et al.*, 2013; BKHARIA *et al.*, 2016a; 2016b). As enzimas digestórias em vertebrados superiores são sintetizadas e secretadas ao longo do tubo digestório. Em peixes, os processos digestórios são primários, no entanto, o conjunto de enzimas é relativamente semelhante ao observado em outros vertebrados. A síntese e níveis apropriados de enzimas digestivas são regulados pela disponibilidade de nutrientes no ambiente, entre outros, os quais variam ao longo do tempo (LÓPEZ-VÁSQUEZ *et al.*, 2009). No estômago, ocorre a produção de suco gástrico, no qual está presente o ácido clorídrico e pepsinogênio, que é a forma inativa da pepsina. O ácido clorídrico apresenta baixo pH, que solubiliza as proteínas, abrindo sua estrutura para facilitar

a ação da enzima proteolítica pepsina. Em pH baixo, o pepsinogênio é convertido em pepsina e a enzima torna-se ativa.

No que diz respeito a biocatalisadores industriais atuantes em pH ácido, destaca-se a pepsina, sendo considerada a principal protease ácida dos peixes, aves e mamíferos (BALDISSEROTTO, 2009). A pepsina (E; C; 3.4.23.1) é incluída na categoria das endopeptidases e é a principal enzima digestória estomacal de peixes (SIMPSON, 2000). A pepsina é uma endopeptidase, isto é, cliva as ligações peptídicas dentro da cadeia polipeptídica e apresenta alta afinidade por aminoácidos hidrofóbicos, como triptofano e a fenilalanina (BAKKE *et al.*, 2011). Algumas pepsinas e pepsinogênios têm sido isolados e caracterizados a partir da mucosa gástrica de espécies de peixes, incluindo a tilápia (EL-BELTAGY *et al.*, 2004; ZHAO *et al.*, 2011; HOMAIEI *et al.*, 2016). A primeira estrutura tridimensional obtida de pepsina de peixe foi da pepsina do bacalhau (*Gadus morhua*) onde se observou que o domínio catalítico e a sua localização eram idênticas à pepsina suína (ANDREEVA *et al.*, 2001).

As proteases ácidas além de serem utilizadas na indústria alimentícia para produção de hidrolisados proteicos e laticínios, podem ser também utilizadas na extração de colágeno e produção de gelatina (KLOMKLAO, 2008; BKHARIA *et al.*, 2016). Para a extração de colágeno de pele de tilápia, os estudos atualmente publicados foram realizados utilizando pepsina comercial de porco (ZENG *et al.*, 2012; SUN *et al.*, 2017).

Diante do exposto, evidencia-se a necessidade de estudos que avaliem o potencial do uso de resíduos do processamento de outras espécies de peixes comerciais importantes, como as vísceras de *C. hippos*, para a obtenção de biomoléculas com aplicabilidade industrial e biotecnológica.

## 2. OBJETIVOS

### 2.1. Objetivo geral

Avaliar o potencial do uso do estômago do peixe xaréu (*Caranx hippos*) como fonte de proteases ácidas para aplicações industriais e biotecnológicas.

### 2.2. Objetivos específicos

- Obter um extrato bruto (EB) a partir do estômago do peixe xaréu;
- Obter uma fração enzimática com alta atividade proteolítica ácida a partir do EB;
- Determinar os efeitos do pH e da temperatura sobre a atividade proteolítica da fração;
- Avaliar o efeito dos íons metálicos e outros agentes químicos sobre a atividade proteolítica da fração;
- Determinar a presença e o número de proteases ácidas na fração através de zimograma.

### 3. MATERIAIS E MÉTODOS

#### 3.1 Obtenção dos estômagos de xaréu e do extrato bruto (EB)

Os estômagos de *Caranx hippos* foram obtidos através de doações de peixarias da região metropolitana da cidade de João Pessoa-PB - e levados em recipiente térmico com gelo em escamas para o Laboratório de Biomoléculas de Organismos Aquáticos (BiOAQUA) DBM – Departamento de Biologia Molecular, da Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa-PB. No laboratório, os estômagos foram devidamente pesados, cortados e congelados em nitrogênio líquido. Após o congelamento, os pedaços foram triturados e homogeneizados com solução de NaCl 0.9%, na proporção de 1:10 (g/ml). Em seguida, o homogenato foi centrifugado durante 20 min. a 10.000 x g, a 4 °C, sendo o sobrenadante coletado denominado de extrato bruto (EB). O EB foi armazenado a -20 °C até sua posterior utilização.

#### 3.2. Ensaio de atividade enzimática e dosagem de proteína solúvel

A atividade proteolítica ácida foi determinada de acordo com Pavlisko *et al.* (1997), utilizando como substrato uma solução de hemoglobina 2% (m/v) em HCl 0,03 M. O resultado foi determinado em leitor de microplacas Multiskan GO (Thermo®). Uma unidade de atividade enzimática foi determinada como sendo a quantidade de enzima capaz de promover uma alteração na absorbância em comprimento de onda de 280nm de 0,1 por minuto de reação. A concentração de proteínas solúveis foi determinada através do método de Bradford *et al.*, (1976), utilizando albumina de soro bovino como padrão, em triplicata.

#### 3.3. Ativação de zimogênios

A ativação de zimogênios, como o pepsinogênio, presentes no EB, foi realizada através da acidificação do mesmo até pH 2,0 através da adição de HCl 6 M. Após ser acidificado, o EB foi incubado durante 60 min. a 25°C. Após a incubação, o EB foi centrifugado a 10.000 xg, a 4°C, durante 10 min., sendo o sobrenadante coletado ao final.

#### 3.4. Pré-purificação e concentração das proteases presentes no EB acidificado

O EB acidificado foi submetido à precipitação salina através da adição de sulfato de amônio até a saturação de 60%. Após 2h de incubação a 4°C, em repouso, a mistura foi centrifugada a 8.000 x g, a 4 °C, durante 20 min. Após a centrifugação o precipitado foi coletado, ressolubilizado em solução de NaCl 0,15 M (pH 2,0) e dialisado com a mesma solução durante 24 h, a 4 °C. A fração 0-60% dialisada foi armazenada e denominada de F60.

### 3.5. Caracterização físico-química da atividade proteolítica ácida da fração F60

Os efeitos do pH e da temperatura sobre a atividade proteolítica de F60 foram avaliados através de metodologia descrita por Gomez *et al.* (2018), com pequenas modificações. Para determinação da temperatura ótima, foram feitos ensaios de atividade enzimática em diferentes temperaturas, na faixa de temperatura de 25 °C a 70 °C. A estabilidade térmica foi determinada através da incubação de alíquotas de F60 durante 30 min. na faixa de temperatura citada anteriormente. Após a incubação as alíquotas foram resfriadas até a temperatura ambiente e ensaios de atividade enzimática foram realizados de acordo com o item 3.2. A determinação do pH ótimo foi realizada através de ensaios de atividade enzimática em diferentes pH na faixa de 1,5 a 7,0 através da adição dos tampões glicina-HCl 0,2 M (pH 1,5 a 2,5) e citrato-fosfato (pH 3,0 a 7,0) ao ensaio. Para a determinação da estabilidade ao pH, alíquotas de F60 foram incubadas durante 30 min. a 25 °C, na proporção de 1:1 (v/v) com os tampões supracitados. Logo em seguida, foram realizados os ensaios da atividade enzimática em triplicata.

### 3.6. Efeitos de íons metálicos, agente redutor e inibidor específico

O efeito de íons metálicos sobre a atividade enzimática foi avaliado incubando-se uma alíquota de F60 em uma solução de íons a 20 mM, na proporção de 1:1, durante 30 min. a 25°C. Em seguida, foi realizado o ensaio de atividade enzimática, de acordo com o item 3.2, utilizando a mistura. Este ensaio foi realizado com cloretos de alumínio ( $\text{Al}^{3+}$ ), cobre ( $\text{Cu}^{2+}$ ), magnésio ( $\text{Mg}^{2+}$ ), chumbo ( $\text{Pb}^{2+}$ ), manganês ( $\text{Mn}^{2+}$ ), cálcio ( $\text{Ca}^{2+}$ ), sódio ( $\text{Na}^+$ ), mercúrio ( $\text{Hg}^{2+}$ ) e cádmio ( $\text{Cd}^{2+}$ ) de acordo com Santos et al. (2013). O efeito do inibidor de proteases aspárticas, Pepstatina A, sobre a atividade proteolítica de F60 foi avaliado incubando-se a enzima, na proporção de 1:1 (v/v) com solução de Pepstatina A (100 µg/ml), durante 30 min, a 25°C. Após a incubação, realizou-se um ensaio de atividade enzimática utilizando a mistura.

O efeito do agente redutor DTT (Ditiotreitol) 1mM, sobre a atividade enzimática foi avaliado na mesma condição do ensaio anterior.

### 3.7. Zimograma

O perfil enzimático de F60 foi determinado através de metodologia descrita por Garcia-Carreño et al. (1993), com modificações. Após a corrida da eletroforese em gel de poliacrilamida, o gel foi lavado em H<sub>2</sub>O destilada e incubado em HCl 0,03 M durante 5 min. a 4 °C. Em seguida, o gel foi incubado com solução de hemoglobina 2% em HCl 0,03 M a 37 °C. Após a incubação, o gel foi lavado em H<sub>2</sub>O destilada e corado com solução de Comassie blue R-250.

### 3.8. Efeitos do NaCl

O efeito do NaCl sobre a atividade proteolítica de F60 foi avaliado através da incubação durante 30 min., a 25 °C, de alíquotas da F60, na proporção de 1:1 (v/v), com solução de NaCl em diferentes concentrações (10, 20 e 30%; m/v) na fração. A atividade residual foi determinada a 37°C durante 10 min., utilizando hemoglobina 2% como substrato.

### 3.9. Análise estatística

Todas as análises anteriormente citadas foram realizadas em triplicata Todos os dados foram analisados por meio de análise de variância ANOVA seguido de teste de Tukey. O software utilizado foi o OriginPro® 8.0 e todos os testes foram realizados com o nível de significância de  $p < 0,05$ .

## 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1. Obtenção das enzimas

O extrato bruto obtido do estômago de *C. hippos* apresentou atividade específica de 439 mU·mg<sup>-1</sup> (Tabela 2). Através de “salting-out”, foi possível conseguir uma purificação de 1,6 vezes com rendimento de 49,4%. A utilização de uma etapa simples para a purificação parcial do extrato bruto e concentração das enzimas é uma vantagem econômica para a utilização comercial deste material em processos industriais que não demandem alto grau de pureza das enzimas, como por exemplo na extração de colágeno, produção de hidrolisado proteico e produção de peixe fermentado. Gomez *et al.* (2018), através do mesmo processo, obteve resultado semelhante usando o estômago do peixe *Prochilodus lineatus*, com um rendimento de 45,1% e uma taxa de purificação de 1,8 vezes para proteases aspárticas.

**Tabela 2.** Purificação parcial de proteases digestórias ácidas de *Caranx hippos*.

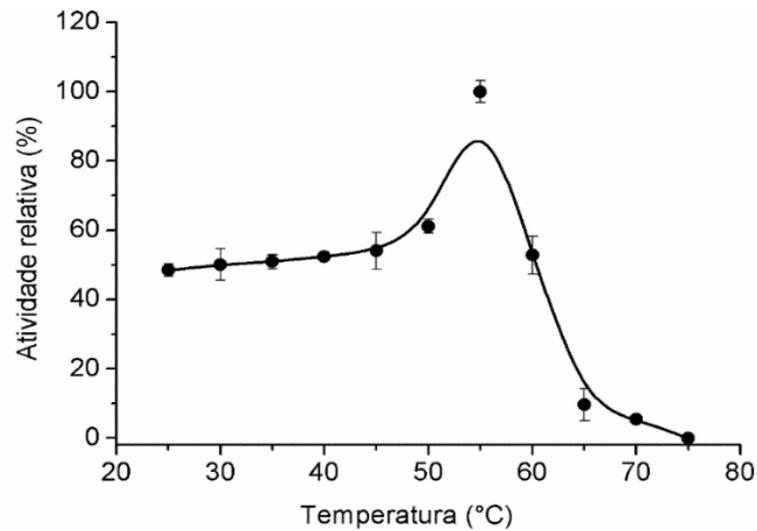
Etapa do processo	*Atividade Total (U)	Proteína Total (mg)	Atividade específica (mU·mg <sup>-1</sup> )	Purificação (vezes)	Rendimento (%)
Extrato Bruto	1.546 ± 50	3.523 ± 102	439	1	100
F60	764 ± 36	1.103 ± 75	693	1,6	49,4

\*Parâmetros estabelecidos para o rendimento de processo utilizando 1L de extrato bruto. Uma unidade de atividade enzimática foi considerada como sendo a quantidade de enzima capaz de modificar a absorbância em 0,1 por minuto de reação.

### 4.2 Efeito da temperatura

Os peixes são animais pecilotérmicos, ou seja, que dependem do ambiente para manterem sua temperatura corporal. Sabendo disso, a temperatura se torna uma grandeza importante a ser investigada, visto a diversidade na distribuição destes animais em todo o globo. A temperatura ótima determinada para a atividade máxima das proteases ácidas presentes em F60 foi de 55 °C (Figura 4).

**Figura 4**– Temperatura ótima para a atividade proteolítica das proteases ácidas presentes em F60.



Fonte: Silva (2020)

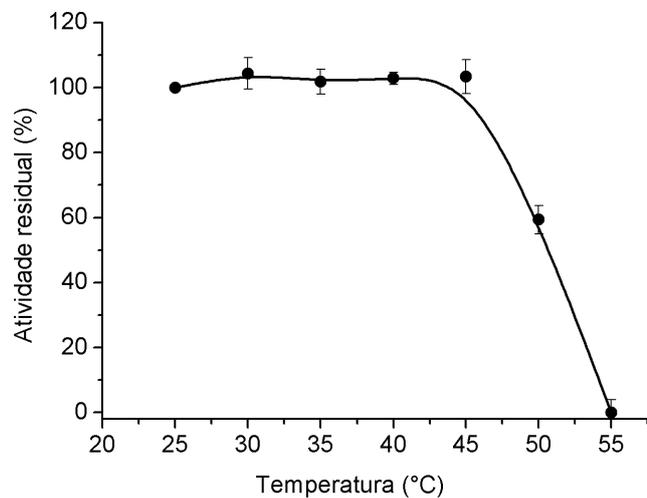
Zhao et al. (2011) afirmam que a temperatura ótima de pepsinas em diferentes espécies de peixes encontra-se em torno de 35 °C e 55 °C, e que há uma relação direta entre a temperatura ótima de pepsinas de peixes e a temperatura das águas que habitam. Peixes tropicais e subtropicais, como o *C. hippos*, apresentando desta forma enzimas com atividade em temperaturas mais elevadas. Bkhairia et al. (2016) caracterizaram as proteases ácidas presentes no extrato bruto do estômago de *Liza aurata* e encontraram a temperatura ótima igual a 40 °C. Quanto às pepsinas A e B do estômago do peixe *Coryphaenoides pectoralis*, Klomklao et al. (2007) identificaram a temperatura ótima como 45 °C. Gomez et al. (2018) estudaram as proteases ácidas presentes no estômago do peixe *Prochilodus lineatus* e determinaram a temperatura ótima como sendo 45 °C. O mesmo resultado foi encontrado para proteases ácidas presentes no extrato bruto das vísceras do peixe *Pangasianodon gigas* (VANNABUN et al., 2014). Ainda, um estudo recente feito com um peixe de água doce, *Colossoma macropomum*, foi relatado a temperatura ótima das proteases ácidas presentes no extrato bruto do estômago deste peixe igual a 50 °C (SILVA et al., 2019).

Zhou et al. (2008) purificaram quatro pepsinas do estômago do peixe *Sparus latus*, P-I, P-II, P-III e P-IV, onde P-II, P-III e P-IV obtiveram temperatura ótima igual a 50 °C, enquanto que P-I obteve temperatura ótima igual a 45 °C. Da mesma maneira, foi reportado por Miura et al. (2015) para as pepsinas do peixe *Micropterus salmoides* a temperatura ótima de 40 °C e

50 °C. Ainda, Nalinanon et al. (2010) também determinaram a temperatura ótima da pepsina presente no estômago do peixe *Thunnus alalunga* como sendo de 50 °C.

Apesar de a temperatura ótima ser um parâmetro importante, para a aplicação comercial é necessário avaliar a estabilidade destas moléculas durante períodos maiores nestas temperaturas. Estes dados também podem ajudar na determinação das condições de armazenamento, transporte e manipulação das mesmas, mantendo sua estrutura nativa preservada. As proteases presentes em F60 foram estáveis na faixa de temperatura de 25 °C a 45 °C (Fig. 5), durante 30 min.

**Figura 5**– Estabilidade térmica das proteases ácidas digestórias presentes em F60.



Fonte: Silva (2020)

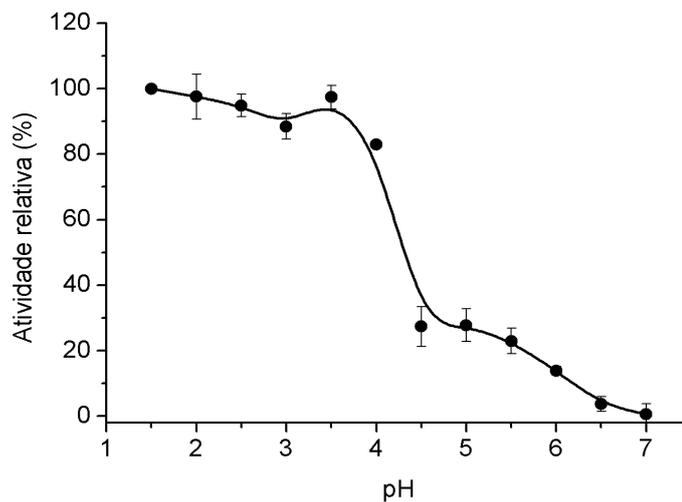
Resultados semelhantes podem ser encontrados na literatura para proteases digestórias ácidas de outros peixes. A estabilidade térmica das pepsinas obtidas do estômago de *T. alalunga* (NALINANON et al., 2010) e *Mustelus mustelus* (BOUGATEF et al., 2008) foi na faixa de temperatura de 20 °C a 50 °C. Silva et al. (2019) observaram estabilidade térmica das proteases digestórias ácidas de *C. macropomum* na faixa de temperatura de 25 °C a 40 °C. Da mesma maneira, foi reportado por Bkhairia et al., (2016) ao estudar proteases ácidas presentes no estômago de *L. aurata* estabilidade térmica até a temperatura de 40 °C. A estabilidade térmica de uma protease aspártica digestória do peixe *Sardinella aurita* também foi até 40 °C (KHALED et al., 2011). Klomklao et al. (2007) demonstraram que as pepsinas de *C. pectoralis*, foram estáveis até 40 °C. Já Gomez et al. (2018), mostraram que as proteases digestórias aspárticas de *P. lineatus* foram estáveis até 37 °C.

Os resultados obtidos utilizando F60 indicam a possibilidade de utilização deste extrato enzimático em processos industriais que possuam aquecimento leve a moderado.

#### 4.3 Efeito do pH

Conhecendo os efeitos do pH sobre uma enzima pode-se, então, determinar as possíveis aplicações industriais e biotecnológicas das mesmas, além de obter parâmetros para preservação de sua atividade durante o armazenamento e transporte em solução. O efeito do pH na atividade catalítica de F60 foi determinado e está apresentado na Figura 6. As proteases digestórias ácidas de *C. hippos* apresentaram uma faixa de pH ótimo entre o pH 1,5 e 3,5, sendo considerada sua atividade máxima no pH 1,5. Contudo, no pH 4,0 a atividade proteolítica ainda foi maior que 80% da atividade máxima. Resultado semelhante foi descrito por Miura et al. (2015), os quais purificaram duas pepsinas, pepsina 1-1 e pepsina 2-2, e obtiveram pH ótimo igual a 1,5 e 2,0 respectivamente, onde em pH 3,5 ainda podia ser observada uma alta atividade proteolítica.

**Figura 6** – pH ótimo para a atividade proteolítica das proteases ácidas presentes em F60.



Fonte: Silva (2020)

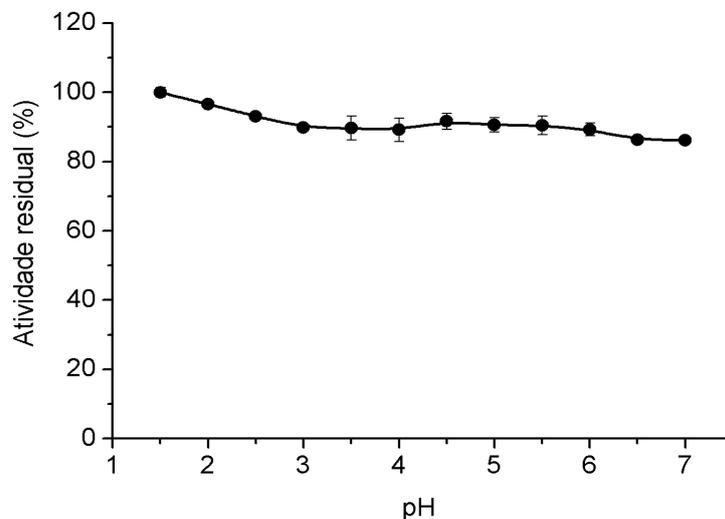
Bkhairia et al. (2016) observaram um pH ótimo igual a 3,0 para as proteases ácidas digestórias de *L. aurata*, assim como foi encontrado para a protease aspártica digestória de *S. aurita* (KHALED et al., 2011). Resultado semelhante foi reportado por Vannabun et al.

(2014), ao caracterizarem as proteases ácidas do estômago de *P. gigas* observaram um pH ótimo igual a 3,0. Tanji et al. (2007) caracterizaram as pepsinas presentes na mucosa gástrica do peixe *Latimeria chalumnae* e observaram para estas um pH ótimo igual a 2,0.

Klomklao et al. (2007) purificaram duas pepsinas de *C. pectoralis*, Pepsina A e Pepsina B, as quais obtiveram pH ótimo igual a 3,0 e 3,5, respectivamente, enquanto que Gomez et al. (2018) caracterizaram as proteases aspárticas digestórias de *P. lineatus* observaram um pH ótimo igual a 2,0. Zhou et al. (2007) caracterizaram as pepsinas de *S. latus* e observaram que as pepsinas P-I, P-III, P-IV obtiveram pH ótimo igual a 3,5. Bougatef et al. (2008) determinaram o pH ótimo da pepsina de *M. mustelus* como igual a pH 2,0. Da mesma maneira foi relatado por Nalinanon et al., (2010) para a pepsina presente no estômago de *T. alalunga*.

O perfil de estabilidade ao pH é mostrado na Figura 7, onde as enzimas foram incubadas por 30 min. e mantiveram mais de 80% de atividade nas faixas de pH 1,5 a 7,0. Por se tratarem de proteases ácidas espera-se que não sejam estáveis em pH muito distantes de seu pH ótimo. Entretanto a atividade proteolítica de F60 foi estável em pH neutro. Segundo Silva et al. (2019) podem existir interações desconhecidas entre as proteases e outras moléculas presentes nos extratos enzimáticos que contribuam com sua estabilidade, quando comparada a uma enzima pura. Ainda, Bkhairia et al. (2016) relataram que enzimas de peixes que habitam águas mais quentes podem ser estáveis até mesmo em pH neutro, o que também poderia explicar o perfil de estabilidade encontrado.

**Figura 7** – Efeito do pH sobre a estabilidade das proteases ácidas presentes em F60.



Um resultado semelhante foi observado por Bkhairia et al. (2016) para as proteases digestórias ácidas do estômago do peixe *L. aurata*, as quais foram estáveis em pH 3,0 a 7,0. Resultado semelhante ao presente estudo foi também encontrado para as proteases ácidas presentes no extrato bruto do estômago de *C. macropomum*, as quais se mantiveram estáveis mesmo em pH 7,0 (SILVA et al., 2019). Enquanto que no estudo de Klomklao et al. (2007), as pepsinas presentes no estômago do peixe *C. pectoralis* foram estáveis entre pH 2,0 e 6,0 sem atividade em pH 9,0. Resultado semelhante foi reportado por Nalinanon et al. (2010) onde as pepsinas presentes no peixe *T. alalunga* foram estáveis em uma faixa de pH 2,0 a 6,0. Enquanto que Bougatef et al., (2008) caracterizaram as pepsinas de *M. mustelus* e observaram que elas se mantiveram estáveis em faixa de pH entre 1,0 e 4,0.

#### 4.4 Efeito de inibidores e íons metálicos na atividade das proteases ácidas

O efeito do inibidor específico de proteases aspárticas (o que inclui a pepsina), pepstatina A, foi avaliado sobre as proteases ácidas presentes em F60. Observou-se a inibição total da atividade proteolítica na presença do inibidor (Tabela 3). Segundo Motwani et al. (2015), a pepstatina A se liga ao sítio ativo da enzima e impossibilita a formação do complexo enzima-substrato. Sendo assim, o resultado deste ensaio indica que as proteases ácidas presentes em F60 pertencem a classe das proteases aspárticas, e por se tratarem de enzimas estomacais poderiam ser do tipo pepsina-símile. Diferentes estudos com peixes, utilizando extratos brutos de estômago ou frações desses extratos, observaram a presença de proteases aspártica através da forte inibição da atividade proteolítica na presença da pepstatina A (MIURA et al., 2015; BKHAIRIA et al., 2016; GOMEZ et al., 2018; SILVA et al., 2019). Da mesma maneira, foi relatado com pepsinas isoladas do estômago de várias espécies de peixe. Nalinanon et al. (2010) demonstraram que a pepsina presente em *T. alalunga* foi inibida totalmente pela Pepstatina A. Da mesma forma, foi demonstrado por Klomklao et al. (2007) ao avaliar o efeito da Pepstatina A nas pepsinas presentes em *C. pectoralis*. Wu et al. (2009) relataram que três pepsinas presentes no estômago de *Anguilla anguilla* foram completamente inibidas por pepstatina A. Ambas as pepsinas isoladas de *Latimeria chalumnae* perderam totalmente sua atividade catalítica na presença deste inibidor (TANJI et al., 2007), da mesma maneira ocorreu com as três pepsinas presentes no estômago de *Lateolabrax japonicus* (CAO et al., 2011).

Ao longo das décadas, a poluição ambiental por metais se tornou um dos problemas mais importantes no mundo (CHANDRAN et al., 2005). O ambiente marinho está continuamente sujeito à poluição química proveniente das atividades antropogênicas que podem aumentar a descarga de metais pesados em várias concentrações nos ecossistemas aquáticos naturais (PAPAGIANNIS et al., 2004) e prejudicar os organismos aquáticos que vivem nesse ambiente (ALINK, 1982). Esta contaminação ocorre devido ao uso extensivo de metais nos processos agrícolas, químicos e industriais (PREGO; COBELO-GARCIA, 2003; CHEUNG et al., 2004). A contaminação de ecossistemas aquáticos por metais pesados aumentou mundialmente, esta poluição é menos visível e imediata que outros tipos, mas seus efeitos sobre o ecossistema e nos seres humanos são intensos e de longo prazo (LANGSTON; SPENCE, 1995). A presença de metais pesados no ambiente é parcialmente devido aos processos naturais, mas é principalmente resultado dos resíduos industriais (MANSOUR; SIDKY, 2002). Desta forma, sendo organismos expostos continuamente, é importante observar o efeito da presença destes contaminantes sobre a atividade de enzimas obtidas de pescado. Vários estudos mostram inibição de enzimas digestivas por metais pesados, entretanto a forma como ocorre a diminuição da atividade da protease digestória na presença de alguns metais possui pouco esclarecimento, no entanto sugere-se que os metais possam influenciar nos sítios de ligações da enzima com o substrato (SILA et al., 2012).

Na Tabela 3 é mostrado que o agente redutor DTT levou a um discreto aumento na atividade catalítica das proteases presentes no xaréu. Este resultado sugere que as proteases presentes no extrato enzimático não possuem pontes de dissulfeto. Ainda, diferentes sais metálicos foram testados a uma concentração final igual a 10 mM. A inibição dos diferentes sais metálicos variou entre 6 e 15%, ou seja, apesar da presença desses íons a enzima manteve uma alta atividade proteolítica, sendo uma importante característica a ser utilizada na indústria. Apesar da presença do  $\text{Ca}^{2+}$  na concentração testada não ter promovido efeito sobre as proteases digestórias ácidas obtidas de *C. hippos*, alguns estudos demonstram a importância do cálcio como cofator de diferentes classes de enzimas, aumentando, então, a atividade das mesmas (KLOMKLAO et al., 2007; BKHAIRIA et al., 2016).

Nalinanon et al. (2010) demonstraram que a atividade proteolítica da pepsina presente em *T. alalunga* não sofreu nenhum impacto após incubação com  $\text{Ca}^{2+}$  a uma concentração final de 5mM onde obteve 102% de atividade. Enquanto que Klomklao et al. (2007) mostraram que a atividade das pepsinas de *C. pectoralis* foi potencializada por cátions divalentes ( $\text{Ca}^{2+}$  e  $\text{Mg}^{2+}$ ). Já Silva et al. (2019) relataram para as proteases de *C. macropomum*

a ativação das proteases digestórias ácidas após incubação com o  $\text{Ca}^{2+}$ . A atividade proteolítica das proteases aspárticas de *L. aurata* não foi afetada pelo íon  $\text{Ca}^{2+}$  da mesma maneira que ocorreu no presente estudo. Bkhairia et al. (2016) afirmaram que este achado se apresenta com um fator para um potencial utilização no processamento de alimentos, como na sua utilização na fabricação de laticínios. Gomez et al. (2018) relataram que a adição do  $\text{Mg}^{2+}$  estimulou a atividade proteolítica das proteases aspárticas digestórias de *P. lineatus*, aumentando em aproximadamente 10% a atividade proteolítica.

**Tabela 3** – Efeito de agentes químicos sobre a atividade proteolítica de F60.

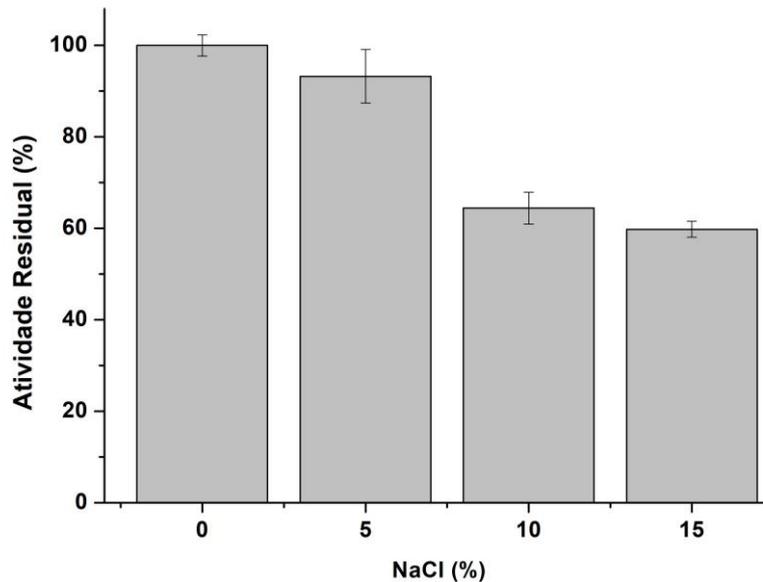
Agente	Atividade Residual (%)	Inibição (%)
Controle	100 ± 4,19 <sup>a</sup>	0
DTT	104 ± 3,25 <sup>a*</sup>	0
$\text{Ca}^{2+}$	101 ± 1,08 <sup>a</sup>	0
$\text{Cu}^{2+}$	98 ± 5,51 <sup>a</sup>	2
$\text{Cd}^{2+}$	97 ± 2,16 <sup>a</sup>	3
$\text{Hg}^{2+}$	94 ± 0,72 <sup>b</sup>	6
$\text{KCl}^+$	91 ± 2,55 <sup>c</sup>	9
$\text{Mn}^{2+}$	90 ± 2,05 <sup>d</sup>	10
$\text{Al}^{3+}$	89 ± 1,20 <sup>e</sup>	11
$\text{Mg}^{2+}$	87 ± 3,35 <sup>f</sup>	13
$\text{Pb}^{2+}$	85 ± 0,10 <sup>g</sup>	15
Pepstatina A	0 ± 1,60 <sup>h</sup>	100

\*Letras sobrescritas diferentes significam diferenças estatísticas em relação ao controle, segundo o teste de Tukey ( $p < 0,05$ ). O controle foi determinado como sendo a atividade enzimática na ausência dos agentes químicos.

#### 4.5. Efeito do NaCl

O efeito do NaCl sobre a atividade das proteases presentes em F60 está representado na Figura 8. Pode-se observar que a atividade proteolítica diminuiu continuamente com o aumento das concentrações de NaCl. Entretanto a enzima manteve uma alta atividade mesmo na presença de uma concentração de 15% deste sal.

**Figura 8** – Efeito do NaCl sobre a atividade proteolítica de F60.



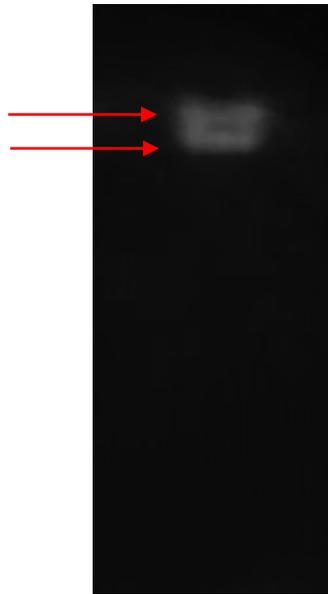
Fonte: Silva (2020)

Outros estudos demonstraram que a diminuição da atividade residual diretamente proporcional ao aumento das concentrações de NaCl. As enzimas de *P. lineatus* (GOMEZ et al., 2018) foram incubadas com 10% de NaCl e a atividade diminuiu 20%. Da mesma maneira, ocorreu para as proteases ácidas digestórias do peixes *P. gigas* (VANNABUN et al., 2014) e pepsinas do *C. pectoralis* (KLOMKLAO et al., 2007), enquanto que uma protease aspártica digestória de *S. aurita* apresentou diminuição de 80% na sua atividade com a mesma concentração de NaCl (KHALED et al., 2011). Klomklao et al. (2007; 2009) explicam que a alta concentração de NaCl pode competir com a enzima na ligação com a água (proteína-água), e, então, resultar em uma interação proteína-proteína mais forte levando à precipitação.

#### 4.6 Zimograma

A zimografia é um método que possibilita a determinação da presença de enzimas ativas em uma amostra, de forma que se torna possível estimar o número de proteases presentes e até mesmo sua identificação com o uso de inibidores específicos. Desta maneira, foi possível observar a presença de duas proteases ácidas em F60 (Figura 9), que podem ser enzimas do tipo pepsina símile devido a sua origem.

**Figura 9**– Zimograma da F60.



Fonte: Silva (2020)

Alguns estudos têm demonstrado que o número de proteases aspárticas digestórias varia entre as diferentes espécies. Nalinanon et al., (2010) encontraram uma única protease ácida digestória em *T. alalunga*. Da mesma maneira, foi reportado por Bougatef et al., (2008) para o peixe *M. mustelus*. Já Cao et al. (2011) e Wu et al., (2009) encontraram três bandas pepsinas ativas nos estômagos de *Lateolabrax japonicus* e *Anguilla anguilla*, respectivamente. O conhecimento do perfil eletroforético, assim como do número de enzimas e suas isoformas presentes numa amostra auxilia no planejamento das etapas e técnicas de purificação necessárias ao isolamento destas proteínas.

## 5. CONCLUSÕES

Através de uma simples etapa de “salting-out” foi possível obter um concentrado proteico contendo proteases aspárticas, com alta atividade proteolítica, a partir do extrato bruto do estômago de *C. hippos*. As características físico-químicas determinadas demonstram que estas enzimas possuem similaridade com pepsinas de peixes. A faixa de pH em que as enzimas obtidas se mantêm ativas indica um potencial para aplicação em processos industriais como a extração enzimática de colágeno. Estas características também demonstram a possibilidade do armazenamento do concentrado enzimático (F60) na forma líquida em pH levemente ácido sem o risco de proteólise. As características relacionadas à temperatura e a resistência à presença de metais pesados reforçam seu potencial industrial. Entretanto, estudos posteriores são imprescindíveis para aperfeiçoar as condições de purificação e promover testes de aplicação em processos industriais em escala laboratorial.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALINK, G. M. Genotoxins in waters. *In*: SORNA, M.; VANIO, H.(eds.). **Mutagens in our Environment**. Alan R. Liss, New York, p. 261–276, 1982.
- ANBE, L.; FERRAZ DE ARRUDA, L.; OETTERER, M. Importância da adoção de programa de gerência do resíduo de processamento da tilápia. **Informações Econômicas** (Impresso), v. 45, p. 1-9, 2015.
- ANDREEVA, N. & RUMSH, L. Analysis of crystal structures of aspartic proteinases: On the role of amino acid residues adjacent to the catalytic site of pepsin-like enzymes. **Protein Science**, v. 10, p. 2439-2450, 2001.
- ARRUDA, L.; BORGHESI, R.; OETTERER, M. Use of fish waste as silage: a review. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 50, p. 879-886, 2007.
- BAKKE, A.; GLOVER, C.; KRODGAHL, A. Feeding, digestion and absorption of nutrients. **The multifunctional gut of fish**, p. 57-75, 2011.
- BALDISSEROTTO, B. Fisiologia de Peixes Aplicada à Piscicultura. **Editora UFSM, Santa Catarina**, 33 p, 2009.
- BEZERRA, R. S.; FREITAS-JÚNIOR, A. C. V. Aproveitamento Integral do Pescado: novos horizontes para o fortalecimento da cadeia produtiva. **Panorama da Aquicultura**, v. 2, p. 48-53, 2015.
- BKHAIRIA, I.; MHAMDI, S.; JRIDI, M.; NASRI, M. New acidic proteases from *Liza aurata* viscera: Characterization and application in gelatin production. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 92, p. 533-542, 2016b.
- BKHAIRIA, I.; KHALED, H. B.; KTARI, N.; MILED, N.; NASRI, M.; GHORBEL, S. Biochemical and molecular characterization of a new alkaline trypsin from *Liza aurata*: Structural features explaining thermal stability. **Food Chemistry**, v 196, p. 1346-1354, 2016a.
- BOUGATEF, A.; BALTI, R.; ZAIED, S.; NASRI, M. Pepsinogen and pepsin from the stomach of smooth hound (*Mustelus mustelus*): Purification, characterization and amino acid terminal sequences, **Food Chemistry**, v. 107, p. 777–784, 2008.
- BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, v. 72, p. 248, 1976.
- BRASIL. Ministério da Pesca e Aquicultura. Boletim estatístico da pesca e aquicultura 2011. Brasília: MPA, 2011. 60p.
- CAO, M. J.; CHEN, W. Q.; DU, C. H.; YOSHIDA, A.; LAN, W.; LIU, G.; SU, W. Pepsinogens and pepsins from Japanese seabass (*Lateolabrax japonicus*), **Comparative**

**Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology**, v. 158, p. 259–265, 2011.

CHANDRAN, R.; SIVAKUMAR, A.A.; MOHANDASS, S.; ARUCHAMI, M. Effect of cadmium and zinc on antioxidant enzyme activity in the gastropod. *Achatina fulica*. **Comp. Biochem. Physiol. C**, v. 140, p. 422–426, 2005.

CHEUNG, C.; SIU, L.; RICHARDSON, J.; DE LUCA-ABBOTT, B.; LAM, S. Antioxidant responses to benzo[a]pyrene and Aroclor 1254 exposure in the green-lipped mussel, *Perna viridis*. **Environ. Pollut.**, v. 128, p. 393–403, 2004.

COSTA, H. M. S.; FREITAS JÚNIOR, A. C. V.; AMARAL, I. P. G.; HIRATA, I. Y. ; PAIVA, P. M. G.; CARVALHO JR, L. B.; OLIVEIRA, V.; BEZERRA, R. S. Metal-sensitive and thermostable trypsin from the crevalle jack (*Caranx hippos*) pyloric caeca: purification and characterization. **Chemistry Central Journal**, v. 7, p. 166-173, 2013.

EL-BELTAGY, A. E.; EL-ADAWY, T. A.; RAHMA, E. H.; EL-BEDAWEY. Purification and characterization of an acidic protease from the viscera of boliti fish (*Tilapia nilotica*). **Food Chemistry**, v. 86, p. 33-39, 2004.

ESPOSITO, T. S.; MARCUSCHI, M.; AMARAL, I. P. G.; CARVALHO JR., L. B.; BEZERRA, R. S. Trypsin from the Processing Waste of the Lane Snapper (*Lutjanus synagris*) and Its Compatibility with Oxidants, Surfactants and Commercial Detergents. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 58, p. 6433-6439, 2010.

FAO - Food and Agriculture Organization. The State of World Fisheries and Aquaculture. Contributing to food security and nutrition for all. **Rome**: 211 pp, 2018.

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

GARCIA-CARREÑO, F. L.; DIMES, L. E.; HAARD, N. F. Substrate-gel electrophoresis for composition and molecular weight of proteinases or proteinaceous proteinase inhibitors. **Anal Biochem**, v. 214, p. 65-69, 1993.

GOMEZ, A. V.; GOMEZ, G.; CHAMORRO, E.; BUSTILLO, S.; LEIVA, L. V. Digestive aspartic proteases from sábalo (*Prochilodus lineatus*): characterization and application for collagen extraction. **Food Chemistry**, v. 269, p. 610–617, 2018.

HE, S.; FRANCO, C.; ZHANG, W. Functions, applications and production of protein hydrolysates from fish processing co-products (FPCP). **Food Research International**, v. 50, p. 289-297, 2013.

HERPANDI, N. H.; ROSMA, A.; WAN NADIAH, W. A. The tuna fishing industry: a new outlook on fish protein hydrolysates. **Food Science and Food Safety**, v. 10, p. 195-207, 2011.

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

KHALED, H. B., GHORBEL-BELLAJ, O., HMIDET, N., JELLOULI, K., ALI, N. E.-H., GHORBEL, S., NASRI, M. A novel aspartic protease from the viscera of Sardinelle (*Sardinella aurita*): Purification and characterisation. **Food Chemistry**, v. 128, p. 847–853, 2011.

KLOMKLAO, S. Digestive proteinases from marine organisms and their applications. **Journal of Science and Thecnology**, v. 30, p. 37-46, 2008.

KLOMKLAO, S.; KISHIMURA, H.; BENJAKUL, S.; SIMPSON, B. Autolysis and biochemical properties of endogenous proteinases in Japanese sandfish (*Arctoscopus japonicus*). **International Journal of Food Science & Technology**, v. 44, p. 1344-1350, 2009.

KLOMKLAO, S.; KISHIMURA, H.; YABE, M.; BENJAKUL, S. Purification and characterization of two pepsins from the stomach of pectoral rattail (*Coryphaenoides pectoralis*). **Comparative Biochemistry and Physiology**, v. 147, p. 682–689, 2007.

KOTORMÁN, M. LACZKÓ, I. SZABÓ, A. SIMON, L. M. Effects of Ca<sup>2+</sup> on catalytic activity and conformation of trypsin and  $\alpha$ -chymotrypsin in aqueous ethanol. **Biochemical and Biophysical Research Communications**. v. 304, p. 2-18, 2003.

LANGSTON, W.; SPENCE, S. K. Biological factors involved in metal concentrations observed in aquatic organisms. **New York' Wiley and Sons**, 1995.

LÓPEZ-VÁSQUEZ, K.; CASTRO-PÉREZ, C. A.; VAL, A. L. Digestive enzymes of eight Amazonian teleosts with different feeding habits. **Journal of Fish Biology**, v. 74, p. 1620-1628, 2009.

LUQUE, J. L.; ALVES, D. R. Ecologia das comunidades de metazoários parasitos, do xaréu, *Caranx hippos* (Linnaeus) e do xerelete, *Caranx tatus* Agassiz (Osteichthyes, Carangidae) do litoral do estado do Rio de Janeiro, Brasil. **Revta bras. Zool.** v. 18, p. 399-410, 2001.

MANSOUR, A. A.; SIDKY, M. Ecotoxicological studies: heavy metals contaminating water and fish from Fayoum Governorate, **Egypt.Food Chemistry**, v. 78, p.15–22, 2002.

MIURA, Y.; KAGEYAMA, T.; MORIYAMA, A. Pepsinogens and pepsins from largemouth bass, *Micropterus salmoides*: Purification and characterization with special reference to high proteolytic activities of bass enzymes. **Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology**, v. 183, p. 42–48, 2015.

MOTWANI, H. V.; DE ROSA, M.; ODELL, L. R.; HALLBERG, A.; LARHED, M. Aspartic protease inhibitors containing tertiary alcohol transition-state mimics. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 90, p. 462–490, 2015.

NALINANON, S.; BENJAKUL, S.; KISHIMURA, H. Biochemical properties of pepsinogen and pepsin from the stomach of albacore tuna (*Thunnus alalunga*). **Food Chemistry**, v. 121, p. 49-55, 2010.

PAPAGIANNIS, I.; KAGALOU, I.; LEONARDOS, J.; PETRIDIS, D.; KALFAKAOU, V. Copper and zinc in four freshwater fish species from Lake Pamvotis (Greece). **Environ. Int.**, v. 30, p. 357–362, 2004.

PASUPULETI, V. K., BRAUN, S. State of the art manufacturing of protein hydrolysates. In: Protein Hydrolysates in Biotechnology, Springer Dordrecht Heidelberg: **New York**, NY, USA, p. 11-32, 2010.

PAVLISKO, A.; RIAL, A.; DE VECCHI, S.; COPPES, Z. Properties of pepsin and trypsin isolated from the digestive tract of *Parona sygnata* “palometa”. **Journal of Food Biochemistry**, v.21, p. 289-308, 1997.

PREGO, R.; COBELO-GARCIA, A. Twentieth century overview of heavy metals in the Galician Rias (NW Iberian Peninsula). **Environ. Pollut.**, v. 121, p. 425–452, 2003.

ROSLAN, J.; KAMAL, S. M. M.; YUNOS, K. F. M.; ADDULLAH, N. Optimization of enzymatic hydrolysis of tilapia (*Oreochromis niloticus*) by-product using response surface methodology. **International Food Research Journal**. v. 22, p.1117-1123, 2015.

SADOWSKA, M.; KOŁODZIEJSKA, I.; NIECIKOWSKA, C. Isolation of collagen from skins of Baltic cod (*Gadus morhua*). **Food Chemistry**, v.81, p. 257–262, 2003.

SANTOS, J. F.; CASTRO, P. F.; LEAL, A. L. G.; FREITAS-JÚNIOR, A. C. V.; LEMOS, D.; CARVALHO, L. B.; BEZERRA, R. S. Digestive enzyme activity in juvenile Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*, L) submitted to different dietary levels of shrimp protein hydrolysate. **Aquaculture International**, v. 21, p. 563-577, 2013.

SGARBIERI, V. C. Proteínas em Alimentos Protéicos: Propriedades, Degradações, Modificações. **Ed. Varela**, São Paulo, p. 517, 1999.

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

SILVA T. F.; PENNA A. L. B. Colágeno: Características Químicas e Propriedades Funcionais. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, São Paulo, v.71, p.530-539, 2012.

SILVA, J. F. X.; RIBEIRO, K.; SILVA, J. F.; CAHÚ, T. B.; BEZERRA, R. S. Utilization of tilapia processing waste for the production of fish protein hydrolysate. **Animal Feed Science and Technology**, v. 196, p. 96–106, 2014.

SILVA, T. A.; et al. Avaliação do uso do estômago do peixe tambaqui (*Colossoma macropomum* Cuvier, 1818) como fonte de proteases ácidas industriais. In: SILVA, Thalia. Meio ambiente: uma visão interativa. João Pessoa: **IMEA**, 2019.

SIMPSON, B. K. Digestive Proteases from Marine Animals. **Seafood Enzymes**, Marcel Dekker, New York, p. 191-213, 2000.

SUN, L.; HOU, H.; LI, B.; ZHANG, Y. Characterization of acid- and pepsin-soluble collagen extracted from the skin of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 99, p. 8-14, 2017.

TANJI, M., YAKABE, E., KAGEYAMA, T., YOKOBORI, S., ICHINOSE, M., MIKI, K., TAKAHASHI, K. Purification and characterization of pepsinogens from the gastric mucosa of African coelacanth, *Latimeria chalumnae*, and properties of the major pepsins. **Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology**, v. 146, p. 412–420, 2007.

VANNABUN, A.; KETNAWA, S.; PHONGTHAI, S.; BENJAKUL, S.; RAWDKUEN, S. Characterization of acid and alkaline proteases from viscera of farmed giant catfish. **Food Bioscience**, v. 6, p. 9–16, 2014.

VIDAL, J. M. A.; RODRIGUES, M. D. C. P.; ZAPATA, J. F. F. VIEIRA, J. M. M. Concentrado proteico de resíduos da filetagem de tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*): caracterização físico-química e aceitação sensorial. **Revista Ciência Agronômica**, v.42, p. 92-99, 2011.

VILLAMIL, O.; VÁQUIRO, H.; SOLANILLA, J. F. Fish viscera protein hydrolysates: production, potential applications and functional and bioactive properties. **Food Chemistry**, v. 244, p.160-171, 2017.

WU, T. *et al*, Identification of pepsinogens and pepsins from the stomach of European eel (*Anguilla anguilla*), **Food Chemistry**, v. 115, p. 137–142, 2009.

ZENG, S.; YIN J.; YANG, S.; ZHANG, C.; YANG, P.; WU, W. Structure and characteristics of acid and pepsin-solubilized collagens from the skin of cobia (*Rachycentron canadum*). **Food Chemistry**, v. 145, p. 1975-1984, 2012.

ZHAO, L; BUDGE, S. M.; GHALY, A. E.; BROOKS, M. S.; DAVE, D. Extraction, Purification and Characterization of Fish Pepsin: A Critical Review. **J Food Process Technol**, v. 2, 2011.

ZHOU, Q.; FU, X.; ZHANG, J.; SU, W.; CAO, M. Purification and characterization of sea bream (*Sparus latus* Houttuyn) pepsinogens and pepsins. **Food Chemistry**, v. 103, p. 795–801, 2007.

ZHOU, Q.; LIU, G.; HUANG, Y.; WENG, L.; HARA, K.; SU, W.; CAO, M. Pepsinogens and Pepsins from Mandarin Fish (*Siniperca chuatsi*), **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 56, p. 5401–5406, 2008.