



UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA  
CENTRO DE CIÊNCIAS EXATAS E DA NATUREZA  
DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA MOLECULAR

PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA CELULAR E  
MOLECULAR

JUCELINELCIA HOUSSEINA SEIDI SEBASTIÃO

**RESÍDUOS DO PROCESSAMENTO DO XERELETE (*Caranx  
latus*, Agassiz, 1831) COMO FONTE DE PROTEASES  
ALCALINAS**

JOÃO PESSOA-PB

2023

JUCELINELCIA HOUSSEINA SEIDI SEBASTIÃO

**RESÍDUOS DO PROCESSAMENTO DO XERELETE (*Caranx  
latus*, Agassiz, 1831) COMO FONTE DE PROTEASES  
ALCALINAS**

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 requisito final para obtenção do título de Mestre em Biologia Celular e Molecular.

**Orientadora:** Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Helane Maria Silva da Costa

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

JOÃO PESSOA-PB

2023

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

S458r Sebastião, Jucelinelcia Housseina Seidi.

Resíduos do processamento do xerelete (*caranx latius*, agassiz, 1831) como fonte de proteases alcalinas / Jucelinelcia Housseina Seidi Sebastião. - João Pessoa, 2023.

47 f. : il.

Orientação: Helane Maria Silva da Costa.

Coorientação: Augusto César Vasconcelos de Freitas Júnior.

Dissertação (Mestrado) - UFPB/CCEN.

1. Macromoléculas biológicas. 2. Organismos aquáticos. 3. Resíduos pesqueiros. 4. Tripsina. I. Costa, Helane Maria Silva da. II. Freitas Júnior, Augusto César Vasconcelos de. III. Título.

UFPB/BC

CDU 573(043)

JUCELINELCIA HOUSSEINA SEIDI SEBASTIÃO

**RESÍDUOS DO PROCESSAMENTO DO XERELETE (*Caranx  
latus*, Agassiz, 1831) COMO FONTE DE PROTEASES  
ALCALINAS**

Dissertação de mestrado avaliada em 29/09/2023

**BANCA EXAMINADORA**

---

Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Helane Maria Silva da Costa

Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular (UFPB)  
Orientadora

---

Prof. Dr. Ulrich Vasconcelos da Rocha Gomes

Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular (UFPB)  
Examinador interno

---

Dr. João Ricardo Gonçalves de Oliveira

Departamento de Biologia Molecular (CCEN/UFPB)  
Examinador externo

---

Prof. Dr. Davi Felipe Farias

Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular (UFPB)  
Suplente interno

---

Prof. Dr. Fábio Marcel da Silva Santos

Departamento de Fisiologia e Patologia (CCS/UFPB)  
Suplente externo

## **Dedicatória**

Esta dissertação dedico ao meu filho Daniel Yosef Seidi Sebastião, minha maior fonte de inspiração, meu elo mais forte, minha maior fonte de aprendizado sobre o amor.

Quando comecei este mestrado eu já era sua morada e desde então a esperança que me impulsiona. E então quando a luz trouxe uma vida renasceu em mim a desbravadora e destemido eu que há muito tempo havia adormecido. Sou muito feliz por ser sua para sempre mamãe. E sim conseguimos, graças a Deus.

N'hamau nha fidju matchu

A Wine Suinila, *in memoriam*

*“A mesma energia de ligação que fornece energia para a catálise também dá às enzimas sua especificidade, isto é a capacidade de discriminar entre um substrato e uma molécula competidora”*

(David L. Nelson & Michael M. Cox)

## AGRADECIMENTOS

À Deus pelo dom da vida, pelo amor, cuidado e provisão, por se fazer presente em minha vida e me direcionar quando estou perdida.

À minha família, César Patrício Fernandes Sebastião meu cônjuge pelo amor, pelo cuidado e pela partilha da vida, e ao meu filho Daniel Yosef Seidi Sebastião a minha maior inspiração para ter força, superação e resiliência.

Aos meus pais Beti Có e Anselmo Seidi, pelo amor, pelos ensinamentos, sacrifícios e direcionamentos, pela base que me trouxe aqui.

À Marilena Cordeiro, minha prima, apoio gigante para mim e para meu filho.

À minha orientadora e amiga Helane Maria Silva Da Costa por todo apoio, cuidado e zelo durante todo o mestrado, obrigada por ter me orientado com humanidade.

Ao meu coorientador Augusto César Vasconcelos de Freitas Júnior pelo excelente professorado, pela orientação, contribuição e partilha de conhecimentos.

À Thalia Andrade Silva, colega de mestrado pela paciência e pelo tempo disponibilizado para me apoiar sempre que precisava nos experimentos.

Às amigas Dércia Rodrigues Indi e Rosilene Nascimento e Renata Tomaz pelas palavras de alívio e suporte sempre que eu precisasse.

Ao Casal Daniel e Shirlene Moreira pelas incontáveis palavras restauradoras e orações.

Aos técnicos dos laboratórios do DBM por todo suporte prestado, e aos funcionários de limpeza em especial a senhora Geralda pela simpatia e educação.

A todos os docentes que fazem parte do PPGBCM e à Ana Pavla Almeida Diniz Gurgel coordenadora por todo apoio e suporte.

Agradeço ao senhor Francisco Assis, pescador e proprietário da peixaria Shalom na praia da Penha, pela doação dos resíduos de xerelete.

## RESUMO

Resíduos de pescados industrialmente produzidos e descartados de maneira inadequada são fonte de poluição, e seu reaproveitamento para extração de macromoléculas biológicas para fins de aplicações industriais tem crescido. O xerelete (*Caranx latus*) é uma espécie de peixe de grande interesse comercial na costa brasileira, o reaproveitamento de seus resíduos para extração de proteases com aplicações industriais pode ajudar a suprir déficit de enzimas na indústria. Através da precipitação com sulfato de amônio foi obtido um concentrado enzimático (F20-80%), com alta atividade de tripsina, a partir do extrato bruto do ceco pilórico do xerelete. O efeito de inibidores e outros agentes químicos sobre a atividade trípica de F20-80% foi avaliado. Também foram determinadas as características físico-químicas das tripsinas presentes em F20-80%. Foi observada uma atividade trípica máxima, de F20-80%, no pH 10,5. As tripsinas presentes em F20-80% foram estáveis na faixa de pH 6 ao pH 11,5. A temperatura ótima para a atividade trípica de F20-80% foi determinada como 45 °C e a estabilidade térmica foi na faixa de 25 à 45°C por 30 min. Os íons metálicos  $Al^{3+}$ ,  $Cu^{2+}$  e  $Hg^{2+}$  e o inibidor TLCK promoveram uma alta inibição da atividade das tripsinas presentes em F20-80%. O agente quelante EDTA e o inibidor TPCK promoveram discreta inibição da atividade trípica de F20-80%. A F20-80% manteve 70% de sua atividade máxima na presença de 7,5% (p/v) de NaCl. A F20-80% não foi compatível com a formulação dos detergentes comerciais em pó testados. O presente estudo sugere que as vísceras do peixe *Caranx latus* podem ser promissoras fontes de proteases alcalinas do tipo tripsina-símile. Apesar de sua incompatibilidade com a formulação química dos detergentes testados, as características físico-químicas apresentadas por estas enzimas, assim como sua estabilidade na presença de elevadas concentrações de NaCl indicam uma promissora utilização em outros setores comerciais, como por exemplo na indústria alimentícia, de colágeno e gelatina. Contudo, outros estudos são necessários para avaliar melhor sua aplicabilidade dentro dos processos em cada indústria.

**Palavras-chave:** macromoléculas; organismos aquáticos; resíduos pesqueiros; tripsina.

## ABSTRACT

Fishery waste industrially produced and improperly discarded is a source of pollution, and its reuse for the extraction of biological macromolecules for industrial applications has grown. The Horse-eye jack (*Caranx latus*) is a fish species with great commercial interest on the Brazilian coast. The reuse of waste generated in its processing to obtain proteases with industrial applications can help to reduce the enzymes deficit at industries. Through ammonium sulfate precipitation, an enzyme concentrate (F20-80%) with high trypsin activity was obtained from the horse-eye jack pyloric cecum crude extract. The effect of inhibitors and other chemical agents on F20-80% tryptic activity was evaluated. The physicochemical characteristics of the trypsins present in F20-80% were also determined. A maximum tryptic activity of F20-80% was observed at pH 10.5. The trypsins present in F20-80% were stable from pH 6 to pH 11.5. The optimum temperature for F20-80% tryptic activity was determined to be 45 °C and the thermal stability was in the range of 25 to 45 °C for 30 min. The metallic ions  $Al^{3+}$ ,  $Cu^{2+}$  e  $Hg^{2+}$  and the TLCK inhibitor promoted a high inhibition of the trypsin activity present in F20-80%. The chelating agent EDTA and the TPCK inhibitor promoted a slight inhibition of the F20-80% tryptic activity. F20-80% maintained 70% of its maximum activity in the presence of 7.5% (w/v) NaCl. The F20-80% was not compatible with the formulation of the commercial powdered detergents tested. The present study suggests that *Caranx latus* fish viscera may be promising sources of trypsin-like alkaline proteases. Despite its incompatibility with the chemical formulation of the tested detergents, the physicochemical characteristics presented by these enzymes, as well as their stability in the presence of high NaCl concentrations, indicate a promising use in other commercial sectors, such as collagen, gelatinthe and food industries. However, other studies are needed to better evaluate its applicability within the processes in each industry.

**Keywords:** aquatic organisms; fishery waste; macromolecules; trypsin.

## **LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS**

BApNA – Benzoil-DL-arginina-p-nitroanilida

EB- Extrato Bruto

EDTA – Ethylenediamine Tetra Acetic Acid

FAO – Food and Agriculture Organization

TLCK – N-p-Tosyl-L-Lysin Chlorometyl Ketone

TPCK – N-Tosyl-L-Phenylalanine Chlorometyl Ketone

SBF- Sobrenadante Final

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Pesca mundial de captura e produção de aquicultura.....	14
<b>Figura 2.</b> <i>Caranx latus</i> (xerelete).....	17
<b>Figura 3 -</b> Mapa de ocorrência mundial de <i>Caranx latus</i> .....	17
<b>Figura 4 -</b> Esquematização de centrifugação diferencial.....	20
<b>Figura 5 -</b> Corte e maceração do ceco pilórico para extração de proteínas.....	24
<b>Figura 6 -</b> Extrato Bruto centrifugado extraído de ceco pilórico de <i>Caranx latus</i> .....	28
<b>Figura 7 -</b> pH ótimo e estabilidade da F20-80% extraída de ceco pilórico do <i>Caranx latus</i> ao pH.....	30
<b>Figura 8 -</b> Temperatura ótima e estabilidade térmica da F20-80% obtida a partir das vísceras do <i>Caranx latus</i> .....	32
<b>Figura 9 -</b> Efeito da concentração de NaCl sobre a atividade trípica presente na F20-80% obtida a partir do ceco pilórico do peixe <i>Caranx latus</i> .....	35
<b>Figura 10 -</b> Compatibilidade da F20-80% com detergentes comerciais.....	36

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1</b> - Composição dos detergentes.....	27
<b>Tabela 2</b> - Efeito de íons metálicos e inibidores de proteases na atividade da F20-80% extraída de ceco pilórico de <i>Caranx latus</i> .....	34

## SUMÁRIO

<b>RESUMO</b> .....	VII
<b>ABSTRACT</b> .....	VIII
<b>LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS</b> .....	IX
<b>LISTA DE FIGURAS</b> .....	X
<b>LISTA DE TABELAS</b> .....	XI
<b>1. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b> .....	14
1.1. Indústria pesqueira e Economia circular.....	14
1.2. Xerelete ( <i>Caranx latus</i> , AGASSIZ, 1831).....	16
1.3. Enzimas: definição, métodos de obtenção e importância biotecnológica.....	17
<b>2. OBJETIVOS</b> .....	23
2.1. Objetivo geral.....	23
2.2. Objetivos específicos.....	23
<b>3. MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	24
3.1. Coleta das amostras e preparo do Extrato Bruto (EB).....	24
3.2. Concentração das proteases alcalinas presentes no extrato bruto do ceco pilórico.....	24
3.3. Determinação da atividade enzimática e dosagem de proteína solúvel.....	25
3.4. Determinação dos efeitos do pH sobre a atividade proteolítica e estabilidade ao pH...25	
3.5. Determinação dos efeitos de temperatura sobre a atividade proteolítica e estabilidade térmica.....	25
3.6. Efeito de íons metálicos e inibidores específicos.....	26
3.7. Efeito de NaCl sobre atividade enzimática da F20-80%.....	26
3.8. Cinética de substrato.....	26
3.9. Compatibilidade com detergentes comerciais.....	26
3.10. Análises estatísticas.....	27
<b>4. RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	28
4.1. Extrato bruto, concentração de proteínas e atividade proteolítica.....	28
4.2. Efeitos do pH sobre a atividade proteolítica e estabilidade ao pH.....	29
4.3. Efeitos da temperatura sobre a atividade proteolítica e estabilidade térmica.....	31
4.4. Efeito de íons metálicos e inibidores específicos.....	32

4.5. Efeito de NaCl sobre a F 20-80% .....	34
4.6. Parâmetros cinéticos.....	35
4.7. Compatibilidade com detergentes comerciais.....	36
<b>5. CONCLUSÃO.....</b>	<b>38</b>
<b>6. REFERÊNCIAS.....</b>	<b>39</b>

## **1. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA**

### **1.1. Indústria pesqueira e a economia circular**

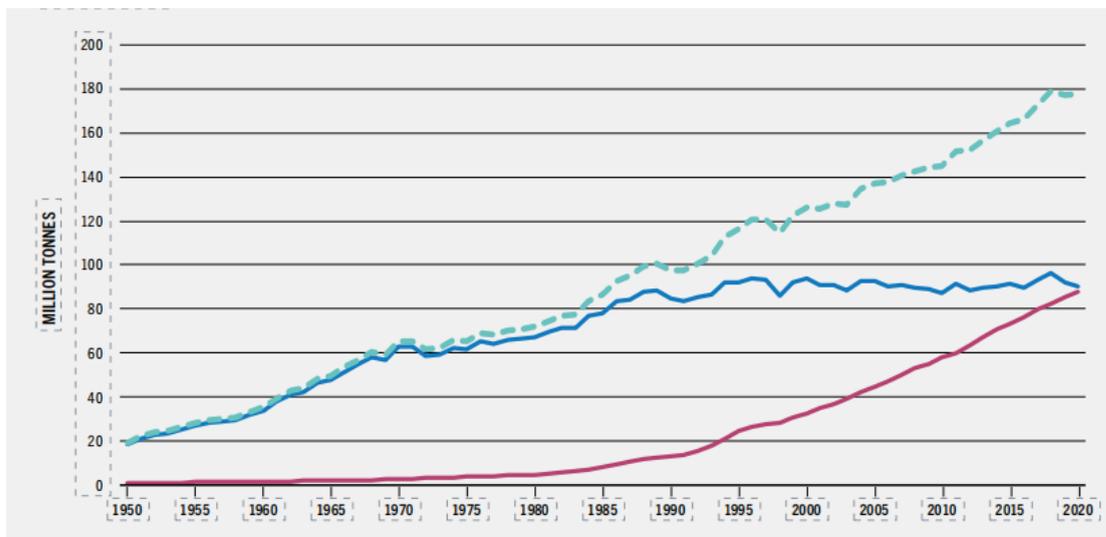
Sabe-se que a exploração dos recursos naturais gera muitas vezes resíduos que rotineiramente são descartáveis, como acontece no ramo de produção alimentar onde diferentes tipos de resíduos orgânicos (restos de comidas e cascas) e não orgânicos (embalagens) são rotineiramente descartados.

No entanto, a preocupação do homem em relação a escassez e esgotamento dos recursos naturais tem aumentado visto que a população humana cresce a cada dia e a capacidade de produção da matéria prima não tem conseguido suprir essas demandas. Todavia, têm-se procurado alternativas que diminuam o impacto ambiental e promovam a sustentabilidade.

A população humana atingiu o marco de oito bilhões de pessoas (UNITED NATIONS, 2022), sabendo que muitas esferas da vida humana está conectada com a diversidade biológica (ROMANELLI, 2015) , o reaproveitamento dos recursos biológicos usando as técnicas da biotecnologia, constituem um avanço significativo para diminuição da poluição e ao mesmo tempo pode ajudar a suprir as demandas da população e otimizar uso de recursos naturais através da economia circular.

A indústria da pesca cresceu nos últimos anos, e tem sido apontada como uma forma de atender a demanda por alimentos (FAO, 2020). Segundo FAO, em 2018 a produção aquícola mundial apresentou um aumento de mais de 5,4% comparado à média de três anos antecedentes onde 156 milhões de toneladas foram utilizadas para consumo humano; e os dados da FAO (2022) estimou que a produção global de animais aquáticos foi cerca de 178 milhões de toneladas em 2020 (Figura 1) sendo que apresentou uma pequena queda comparado a 2018 que teve um recorde histórico de 179 milhões de toneladas. Dessa quantidade, mais de 157 milhões de toneladas (89%) foram utilizadas para consumo humano, e 20 milhões de toneladas foram destinadas a produtos não alimentares.

**Figura 1.** Pesca mundial de captura e produção de aquicultura



\*Não inclui produção de algas. Fonte: FAO, 2022.

Os resíduos dos organismos aquáticos constituem um sério problema de poluição ambiental (SILVA et al., 2011; CASTRO-CASEÑA et al., 2012; KLOMKLAO et al., 2018). Tanto resíduos dos animais pescados quanto aos resultantes da aquicultura que popularmente são conhecidas como xerelete, tilápia, sardinha, robalo-flecha, salmão dentre outros, estudados para fins de piscicultura devido seus valores nutricionais, podem gerar grandes volumes de resíduos. Focar os estudos em buscas de alternativas menos comprometedoras para o meio ambiente é uma tarefa longa e incansável quando comparada à praticidade de exploração por outros meios.

Na economia circular se valoriza o reaproveitamento dos recursos naturais, por isso resíduos sólidos orgânicos urbanos podem servir de meio de cultura para produção de proteases bacterianas termoestáveis que são compatíveis com os detergentes (EMON et al., 2020), a exemplo de restos biológicos como palha e farelo de arroz, farelo de trigo e até mesmo penas de galinhas podem ser utilizados como meio de cultura para produção de proteases fúngicas (KUMAR 2020; CHATTERJEE et al., 2015), assim como resíduos de organismos aquáticos produzidos industrialmente também podem servir de meio de cultura e principalmente fontes dessas proteases. Resíduos intestinais de peixes podem ser utilizados como meio de cultura para produção de proteases alcalinas de bactérias (RAMKUMAR et al., 2018; FAHMY e EL-DEEB, 2023).

Proteases de diferentes organismos são estudadas, por exemplo, de bactérias que causam perdas na indústria de pesca devido a deterioração nos peixes (ACCUMANNO et al.,

2019); enzimas de polvos estáveis em temperaturas elevadas (IBARA-GÁRCIA et al., 2018); proteases de fungos que apresentam 90% de sua atividade catalítica na faixa de temperatura de 50°C - 90 °C (DE OLIVEIRA et al., 2020; DE OLIVEIRA et al., 2021). Proteases fúngicas também podem ser utilizadas para aumentar hidrolisados proteicos com elevadas atividades antioxidantes e antitumorais (AHMED et al., 2023), além de agir como dessensibilizador de proteínas de leite (YANG et al., 2020). Enzimas de peixes como encapsulados proteicos para suplementação (BUAMARD et al., 2020) ou no pré-tratamento no processo de extração de filmes gelatinosos (FAN et al., 2020), dentre inúmeras outras aplicações das proteases. Todos esses estudos biotecnológicos enfatizam a importância dessas macromoléculas biológicas para fins de aplicações industriais com diminuição de custos usando resíduos biológicos de baixo custo. Tripsina de vísceras de peixes são estudadas e demonstradas como ótimas opções para fins de aplicações industriais. A tripsina do xaréu (*Caranx hippos*) demonstrou ser uma enzima apta a ser usada em processos industriais que requerem alcalinidade e amplitude na faixa de temperatura além da estabilidade durante o processo (COSTA et al., 2013).

## **1.2. Xerelete (*Caranx latus*, Agassiz, 1831)**

A espécie *Caranx latus* (Figura 2), popularmente conhecido em Guiné-Bissau como carapau, no Brasil como xerelete e internacionalmente como horse-eye jack, é uma espécie de peixe pertencente à família Carangidae descrita em 1831 por Agassiz. São animais pelágicos e carnívoros geralmente de água doce ou estuarinas associadas a recifes que se alimentam de peixes menores e crustáceos. Pouco se tem de dados acerca de vários aspectos da biologia de xerelete, muito embora seja uma espécie comercialmente explorada em todo litoral brasileiro, e como consequência geração de resíduos orgânicos considerável, visto que ocorre em dezessete (17) estados brasileiros (FLOETER et al., 2003; FEITOZA et al., 2005).

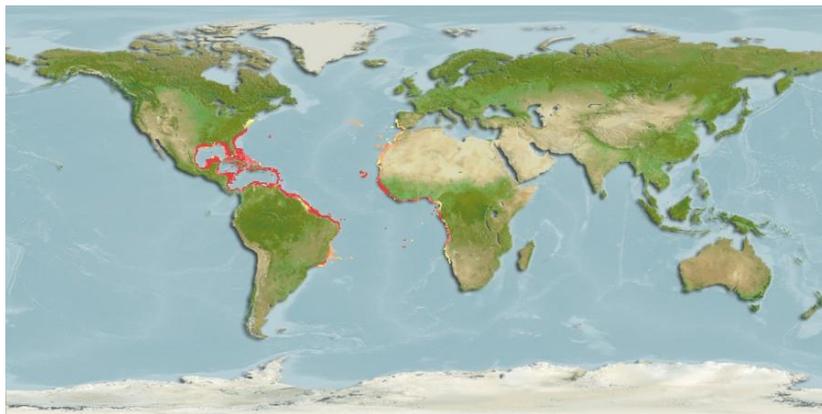
**Figura 2.** *Caranx latus* (xerelete)



**Fonte** <https://www.fishbase.se/photos/PicturesSummary.php?resultPage=6&ID=1935&what=species> acesso em 11/08/2023

O *Caranx latus* tem uma distribuição geográfica mundial extensa no Atlântico ocidental de Nova Jersey nos EUA a São Paulo (Brasil) e na costa Este do Atlântico do Arquipélago de São Pedro e São Paulo (Brasil) até o Golfo da Guiné como mostra Figura 3 (pontos vermelhos). No ano de 2011, último dado divulgado pelo governo brasileiro sobre a estatística da pesca extrativa nacional, foram pescados aproximadamente 3.360 t da espécie *C. latus* (MPA, 2011).

**Figura 3.** Mapa de ocorrência mundial de *Caranx latus*.



**Fonte:** <https://www.fishbase.se/summary/SpeciesSummary.php?id=1935&lang=English> acesso em 11/08/2023

### **1.3. Enzimas: definição, métodos de obtenção e importância biotecnológica**

As proteínas estão entre as principais macromoléculas dos organismos vivos, elas

apresentam funções variadas que vão desde função estrutural, regulação da expressão gênica, função contrátil, reserva energética, defesa do organismo, transporte e sobretudo função enzimática. De acordo com NELSON E COX (2019), as proteínas são blocos construtoras das estruturas musculares e catalisadores moleculares nos sistemas biológicos, e que essa função catalítica permite que as proteínas enzimáticas transformem quimicamente as moléculas que a elas se ligam.

A extração de compostos macromoleculares com variadas atividades funcionais tem sido feita em bactérias, fungos, plantas e animais principalmente. Sendo a função catalítica uma das mais importantes exploradas pelas indústrias ela é assim foco de extração para produção de inúmeros produtos e processos biotecnológicos. As enzimas são proteínas mais notáveis e altamente especializadas com alto grau de especificidade para seus devidos substratos acelerando reações químicas em soluções aquosas sob condições de pH e temperatura suaves. (NELSON e COX, 2019).

Com a biotecnologia, essas macromoléculas são essencialmente usadas pelas indústrias na produção de alimentos e bebidas, materiais de limpeza e higiene, roupas, produtos de papel, combustíveis de transporte, produtos farmacêuticos e dispositivos de monitoramento (PRASAD e ROY, 2018), na produção de ração animal, na indústria de têxteis, tratamento de resíduos, dentre outras (CHUNG et al., 2021; PANDEY et al., 2022). Muito embora as enzimas forneçam maquinaria ideal para o metabolismo celular onde o meio é controlável em termos de fisiologia, para fins industriais, a variabilidade e instabilidade do meio podem interferir na sua eficácia visto que as enzimas apresentam uma certa especificidade no seu funcionamento durante o metabolismo celular, razão pela qual se faz necessário estudos e escolhas de moléculas capazes de apresentar estabilidade a meios variados sem perderem suas atividades.

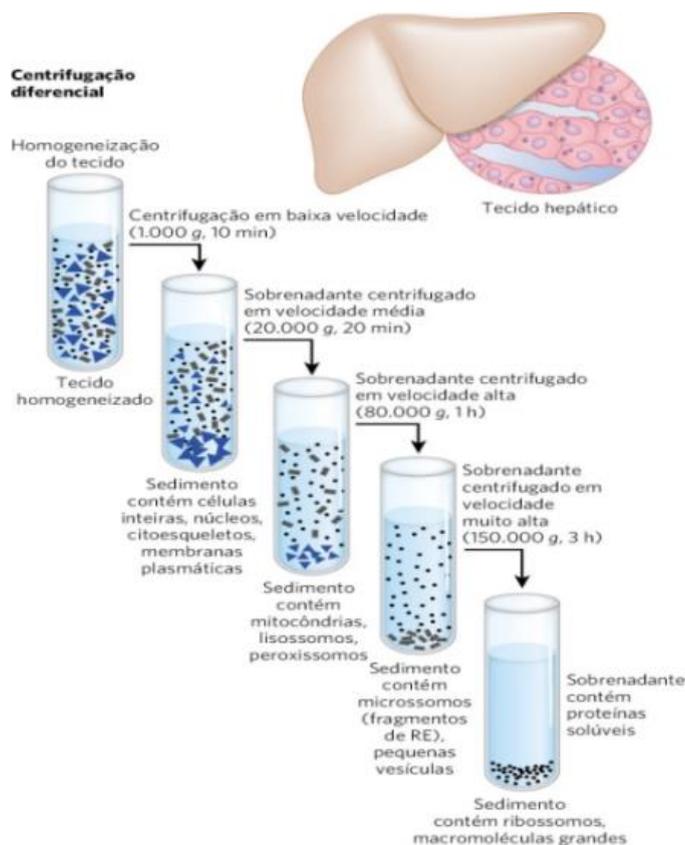
As técnicas de purificação de proteínas são variadas e dependem do grau de pureza e características que se deseja estudar. Proteases ácidas e alcalinas para serem purificadas se faz uso de técnicas clássicas de extração e processos de isolamento proteicos, iniciando-se com a preparação de extrato bruto. A obtenção do extrato bruto proteico é decorrente do rompimento celular e liberação de suas proteínas em uma solução (NELSON e COX, 2019) salina ou tampão. Para romper a célula e liberar seus conteúdos usa-se diferentes técnicas Quadro 1 tais como a trituração manual por exemplo (BRACHT, 2002) e o homogeneizado de extrato pode ser centrifugado diferencialmente para separação de conteúdos subcelular (Figura 4).

**Quadro 1.** Métodos gerais para ruptura de células

<b>Tipos de técnicas</b>	<b>Exemplos de aplicações</b>
<i><b>Métodos Suaves</b></i> Lise osmótica Digestão enzimática Solubilização química/autólise Trituração manual	Lise de eritrócitos com água Tratamento das bactérias com lisozima Extração de leveduras com tolueno Tecidos animais moles em geral
<i><b>Métodos moderados</b></i> Homogeneização com liquidificador Trituração com abrasivo (alumina, areia, pérolas de vidro)	Maioria dos tecidos vegetais e animais Bactérias, fungos e tecidos vegetais
<i><b>Métodos vigorosos</b></i> Prensa francesa Sonificação	Bactérias, fungos e tecidos vegetais Suspensão de células

Quadro adaptado do livro Bracht e Ishii-Iwamoto, 2003. Métodos de laboratório em bioquímica, pag 196.

**Figura 4.** Esquematização de centrifugação diferencial



Fonte: Princípios de Bioquímica de Lehninger, 7 ed. pag 9.

Em seguida o sobrenadante passa por fracionamento salino com sulfato de amônio e as frações resultantes são dialisadas. O fracionamento visa a separação de proteínas levando em consideração carga ou tamanho e sua solubilidade, e os fatores como pH, e temperatura dentre outros parâmetros podem interferir na solubilidade da proteína. A adição de sais induz a agregação proteica (*salting-out*) pela remoção de água que hidrata as proteínas, essa remoção faz com que as moléculas fiquem menos solúveis precipitando-se. Outras técnicas de purificação como as cromatográficas e eletroforéticas, podem ser utilizadas independentemente para purificação de proteínas.

Enzimas provenientes de diferentes organismos dos reinos Archaea, Bacteria e Eucarya são manipuladas com as técnicas de biologia molecular para fins industriais, sendo macromoléculas bastante exploradas. Uma das principais classes enzimáticas de interesse na biotecnologia são as hidrolases, essas enzimas realizam catálise ao transferir grupos funcionais para moléculas de água, e dentre elas destacam-se as proteases. Proteases catalisam hidrólise de ligações peptídicas em uma proteína ou peptídeo. Tanto as proteases ácidas quanto as alcalinas são importantes na biotecnologia para interesses industriais.

As enzimas digestivas, por exemplo as proteases, são catalisadores ideais para a biotecnologia, elas correspondem a cerca de trinta por cento no mercado mundial das enzimas (CHATTERJEE et al., 2015) ocupando uma posição de destaque no cenário mundial das enzimas utilizadas nas indústrias para produção de produtos diversos (MATKAWALA et al., 2021) senão a maior parcela de proteínas industrialmente produzidas no cenário mundial (ROZANOV et al., 2021). Extrato de protease purificado de *Carangoides bartholomaei* (Cuvier, 1833) utilizado na extração de colágeno a partir de escamas de tilápia do Nilo dobrou o rendimento do processo (SILVA et al., 2021), além disso estudo de proteases aspárticas extraídos dos resíduos estomacais de *C. hippos* demonstrou estabilidade térmica a 45 °C (SILVA et al., 2021).

Proteases alcalinas são comumente utilizados como um componente aditivo em detergentes (YOUNES et al., 2015) ou agente de limpeza e também lipases como biocatalisadores (PRASAD e ROY, 2018). Por serem biodegradáveis e apresentarem maior eficiência, os catalisadores biológicos são apontados como promissores pelas indústrias na substituição dos catalisadores químicos (CARDOSO DOS SANTOS et al., 2020). Estudos sugerem que as vísceras dos peixes podem ser uma fonte potencial de proteases alcalinas para aplicações industriais que exigem condições alcalinas elevadas (YOUNES et al., 2015). Um estudo feito por SAE-LEAW e BENJAKUL em 2018, demonstrou que a lipase extraída do fígado do robalo (*Lates calcarifer*) foi capaz de remover lipídeos da pele de peixe, demonstrando sua capacidade para remoção de gorduras. PATCHIMPET, et al (2019) demonstraram que lipase extraída de vísceras de tilápia eram capazes de aumentar a remoção de gorduras pelos detergentes lava-louças comerciais, sendo assim um ótimo aditivo para aumento da eficácia. Diversas proteases alcalinas de fungos e bactérias apresentam atividade ótima em pHs elevados entre 9,5 e 11 (OMRANE BENMRAD et al., 2019; MECHRI et al., 2019; OUELHADJ et al., 2020).

A tripsina é uma enzima que catalisa a quebra de ligações peptídicas em que o grupo carbonila é fornecido tanto por um resíduo de Lys quanto por um Arg durante a hidrólise proteica (SILVA et al., 2011; UNAJAK et al., 2012). Sintetizada no pâncreas como precursor tripsinogênio posteriormente convertida pela enteroquinase em tripsina ativa no trato digestório, essa enzima é importante nos processos biológicos como digestão e ativação de zimogênios de quimotripsina (BEM KHALED et al., 2011; NELSON e COX, 2019). Vários estudos têm demonstrado que as vísceras dos peixes sob determinadas condições podem ser usadas como fonte de tripsina para aplicações industriais (CASTILLO-YÁÑES et al., 2005;

SOUZA et al., 2007; FREITAS JÚNIOR et al., 2012; COSTA et al., 2013; CARRETA-VALDEZ et al., 2019). KHANTAPHANT e BENJAKUL (2010) observaram que a tripsina extraída do ceco pilórico de *Lutjanus vitta* tinha atividade catalítica estável a 55°C, a mesma temperatura foi descrita para *Lutjanus analis* por MEDEIROS et al, (2015). BEZERRA et al (2005) encontraram estabilidade da tripsina de tilápia na faixa de 50°C, KHANGEMBAM e, CHAKRABART (2015) descreveram estabilidade térmica na mesma faixa de temperatura.

Sendo reaproveitadas, as vísceras podem ser usadas para fins como a extração e purificação de macromoléculas biologicamente ativas como proteases, que podem substituir a utilização de produtos químicos sintéticos. As vísceras de peixe podem representar até 30% do peso total do animal e as proteínas digestivas nelas encontradas representam uma importante classe de enzimas utilizadas nas indústrias (BEZERRA, et al; 2005). O trato digestivo de peixes (principalmente os carnívoros) é rico em proteases como quimotripsina, elastase e tripsina que são mais ativa em pH 8,0 e 10, e com variadas aplicações industriais e importantíssimo na indústria de alimentos (BOUGATEF et al., 2007).

Devido ao impacto ambiental gerado pela constante utilização de compostos químicos no ambiente, alternativas como utilização de biomoléculas capazes de substituir esses compostos são de crucial importância para o desenvolvimento sustentável, principalmente se a extração dessas biomoléculas for feita através do reaproveitamento de resíduos considerados inutilizáveis e com baixo custo de extração e purificação em grande escala, sendo assim alternativas ecologicamente corretos. Este trabalho teve como proposta a extração e caracterização de proteases de vísceras de xerelete (*Caranx latus*) por ser uma espécie popularmente conhecida e consumida no mercado brasileiro especialmente no nordeste do país, portanto, gera muitos resíduos viscerais na indústria pesqueira, partindo da hipótese de que suas vísceras podem servir de uma ótima fonte dessas proteases tendo um custo de extração relativamente baixo.

## **2. OBJETIVOS**

### **2.1. Objetivo geral**

Extrair e caracterizar a atividade de proteases digestivas alcalinas obtidas do xerelete (*Caranx latus*).

### **2.2. Objetivos específicos**

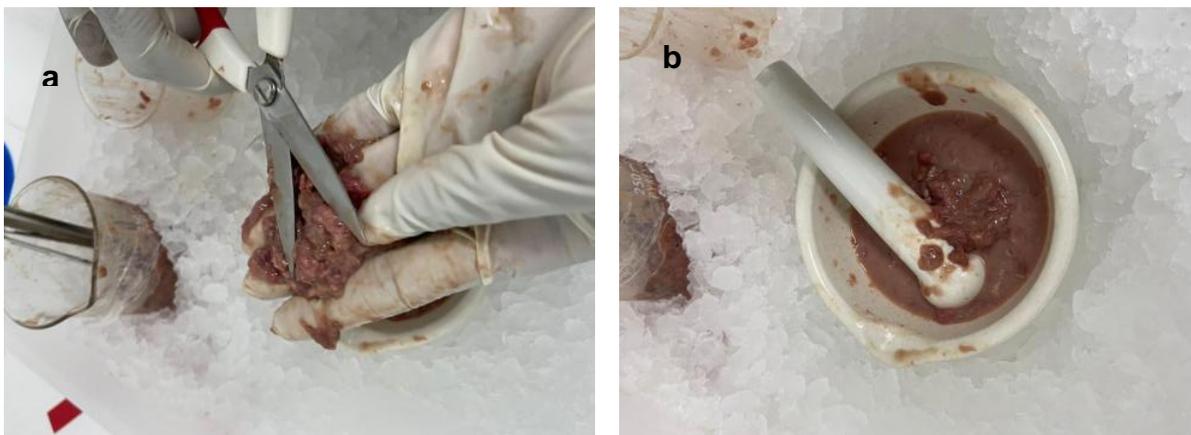
- a) Obter um extrato bruto alcalino (EB) a partir das vísceras digestivas do xerelete;
- b) Determinar atividade proteolítica alcalina presente no EB;
- c) Obter frações proteicas alcalinas com atividade enzimática utilizando sulfato de amônio;
- d) Determinar os parâmetros físico-químicos e cinéticos da fração de proteínas obtidas;
- e) Avaliar o efeito de íons metálicos e inibidores de proteases na atividade enzimática da fração proteica;
- f) Determinar o efeito de diferentes concentrações de NaCl sobre a atividade enzimática alcalina da fração proteica obtida;
- g) Investigar a compatibilidade das proteases alcalinas presentes na fração proteica com detergentes comerciais.

### 3. MATERIAIS E MÉTODOS

#### 3.1. Coleta das amostras e preparo do Extrato Bruto (EB)

Os resíduos do processamento de peixes (vísceras) foram obtidos em unidades de pescadores artesanais no litoral da Paraíba e peixarias locais na cidade de João Pessoa. Estes resíduos foram transportados sob refrigeração para Laboratório de Biomoléculas de Organismos Aquáticos (BiOAQUA/DBM/UFPB). Todo material foi dissecado, os cecos pilóricos foram separados, pesados e armazenados a  $-20^{\circ}\text{C}$  para uso posterior. Para obtenção do extrato bruto (EB) (Figura 5b), o material previamente dissecado foi descongelado cortado (Figura 5a) e mantido no gelo durante a homogeneização, em Tris-HCl 0,01M pH 8,0 contendo NaCl 0,15M, na proporção 5:1 (m/v), e em seguida foi feita a centrifugação à  $10.000 \times g$  a  $4^{\circ}\text{C}$  por 20 min usando centrífuga refrigerada modelo NT 815 (NOVATECNICA<sup>®</sup>). O sobrenadante obtido foi denominado como extrato bruto.

**Figura 5.** Corte e maceração do ceco pilórico para extração de proteínas



Corte (a) e homogeneização (b) do ceco pilórico de xerelete (*Caranx latus*) para extração de proteínas. **Fonte:** Sebastião (2023)

#### 3.2. Concentração das proteases alcalinas presentes no extrato bruto do ceco pilórico

A concentração foi realizada através de precipitação salina com sulfato de amônio nas concentrações de 20% e 80%, obtendo-se as frações proteicas F0-20%, F20-80% e sobrenadante final (SBF). Em seguida, as frações obtidas foram dialisadas a  $4^{\circ}\text{C}$ , durante 12h, em tampão Tris-HCl 0,01 M pH 8,0 contendo NaCl 0,15 M. Em seguida foi avaliada a atividade trípica de cada fração, sendo a fração com maior atividade enzimática denominada de concentrado enzimático e utilizada nas demais análises.

### **3.3. Determinação da atividade enzimática e dosagem de proteína solúvel**

A atividade trípica foi determinada a 25°C, de acordo com FREITAS-JÚNIOR et al. (2012), utilizando o Benzoil-L-Arginina-*p*-Nitroanilida (BApNA) 8 mM como substrato. Uma unidade (U) de atividade trípica foi considerada como a quantidade de enzima capaz de produzir 1 μmol de *p*-nitroanilina por minuto de reação. A atividade proteolítica alcalina total foi determinada a 37°C de acordo com Bezerra et al. (2005) utilizando solução de azocaseína 1% (m/v) pH 8,0 como substrato. Uma unidade (U) de atividade proteolítica alcalina total foi considerada como a quantidade de enzima capaz de promover alteração de 0,001 na absorbância a 450 nm por minuto de reação. A proteína solúvel foi determinada através de espectrofotometria pelo método descrito por Warburg e Christian (1942), utilizando a fórmula:

$$\text{mg proteína/mL} = [(1.31 \times A_{280}) - (0.57 \times A_{260})] \times \text{fator de diluição}$$

### **3.4. Determinação dos efeitos do pH sobre a atividade proteolítica e estabilidade ao pH**

O pH ótimo e a estabilidade ao pH da F20-80% foram avaliados de acordo com COSTA et al. (2013). Utilizando diferentes tampões na faixa de pH 5,0 a 11,5 para a determinação do pH ótimo. Para determinar o efeito do pH na estabilidade das enzimas, foram incubadas alíquotas de amostra contendo as enzimas com tampões em diferentes pHs, na faixa de pH 5,0 a 11,5 a 25°C. Em seguida, o pH da mistura foi alterado para o pH ótimo anteriormente determinado e foi realizado ensaio de atividade enzimática conforme descrito anteriormente.

### **3.5. Determinação dos efeitos da temperatura sobre a atividade proteolítica e estabilidade térmica**

A temperatura ótima e a estabilidade térmica da F20-80% foram avaliados de acordo com COSTA et al. (2013). A atividade proteolítica foi realizada em diferentes temperaturas, na faixa de temperatura de 25°C a 80°C, para determinação da temperatura ótima; Avaliou-se a estabilidade térmica na faixa de temperatura de 25°C a 80°C através da incubação da amostra contendo as enzimas durante 30 minutos na temperatura investigada. Após a incubação, a amostra foi resfriada a 4°C e se realizou ensaio de atividade enzimática a temperatura ambiente.

### **3.6. Efeito de íons metálicos e inibidores específicos**

O efeito de íons metálicos foi avaliado de acordo com FREITAS-JÚNIOR et al. (2012) com modificações, incubando-se as enzimas, 1:1 (v/v), por 30 min., com soluções de cloretos AlCl<sub>3</sub>, CdCl<sub>2</sub>, HgCl<sub>2</sub>, PbCl<sub>2</sub>, CaCl<sub>2</sub>, CuCl<sub>2</sub>, NaCl, KCl, MgCl<sub>2</sub>, ZnCl<sub>2</sub> (0,01 M, concentração final). Após a incubação foi realizado o ensaio de atividade enzimática utilizando BApNA 8mM como substrato. O efeito de inibidores específicos de proteases foi avaliado incubando-se uma alíquota da amostra contendo as enzimas, 1:1 (v/v), durante 30 min., com solução de inibidor específico de proteases. *N-p-Tosyl-L-Lysin Chlorometyl Ketone* (TLCK), *N-p-Tosyl-L-Phenylalanine Chlorometyl Ketone* (TPCK) foram os inibidores utilizados e o agente quelante *Ethylenediamine Tetra Acetic Acid* (EDTA). Após a incubação foi realizado o ensaio de atividade enzimática conforme descrito anteriormente.

### **3.7. Efeito de NaCl sobre atividade enzimática**

O efeito de NaCl na atividade enzimática foi avaliado usando BApNA como substrato a pH 8,0 em 25°C com adição de NaCl nas concentrações de 1-30% (w/v) à mistura de reação, de acordo com o método usado por Klomklao et al. (2009)

### **3.8. Cinética de substrato**

A cinética de substrato foi realizada de acordo com Costa et al. (2013) utilizando 30 µL de BApNA nas concentrações finais de 0,15 mM à 4,8 mM. As reações foram feitas em triplicatas e os dados calculados na equação de Michaelis–Menten usando o programa MicroCal<sup>®</sup>Origin<sup>®</sup> Versão 8,0 (MicroCal, Northampton, MA, EUA).

### **3.9. Compatibilidade com detergentes comerciais**

A compatibilidade da F20-80% com detergentes comerciais foi testada incubando a enzima com detergentes comerciais sólidos seguindo a metodologia descrita por Espósito et al. (2010). Foram utilizadas quatro marcas de detergentes sólidos nomeados Produto um (1), Produto dois (2), Produto três (3), e Produto Quatro (4), cujas composições estão descritas na Tabela 1.

**Tabela 1.** Composição dos detergentes em pó utilizados nos testes.

<b>DETERGENTE</b>	<b>COMPOSIÇÃO</b>
Produto 1	Tensoativo aniônico, tamponantes, coadjuvantes sinergistas, cargas, fragrância, branqueador óptico, enzimas, corante.
Produto 2	Tensoativo aniônico, tamponantes, coadjuvantes sinergistas, cargas, fragrância, branqueador óptico, enzimas, corante, alquil benzeno sulfonato de sódio.
Produto 3	Tensoativo aniônico, alcalinizante, sequestrante, carga, coadjuvantes, enzimas, branqueador óptico, corante, agente antidepositante, fragrância e água.
Produto 4	Branqueador óptico, ácido linear alquilbenzeno sulfônico, alcalinizantes, coadjuvantes, carga, corante, fragrância e água.

### **3.10. Análises estatísticas**

Todos os experimentos foram realizados em triplicata e expressos em médias  $\pm$  desvio padrão. Um valor de probabilidade de  $p < 0,05$  foi considerado significativo. Os dados foram estatisticamente analisados por ANOVA e Teste Tukey. As análises foram realizadas utilizando o programa de estatística MicroCal<sup>®</sup> Origin<sup>®</sup> Versão 8,0 (MicroCal, Northampton, MA, EUA). Não houve tratamento de dados.

## 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1. Extrato bruto, concentração de proteínas e atividade proteolítica

Foi possível utilizar resíduos do processamento pesqueiro (ceco pilórico) do xerelete como fonte de protease alcalina do tipo tripsina-símile (Figura 6). Após as etapas descritas nos tópicos 4.1, 4.2 e 4.3, o material obtido Extrato Bruto (EB) e F20-80% apresentaram uma atividade trípica específica de  $32 \pm 0,3 \text{ U}\cdot\text{mg}^{-1}$  e  $120 \pm 0,5 \text{ U}\cdot\text{mg}^{-1}$  (respectivamente). Após a diálise, a F0-20% e o SBF obtidos não apresentaram atividade enzimática considerável, e por esse fator a F20-80% foi escolhida para restante dos experimentos neste trabalho. A utilização do sulfato de amônio na etapa de concentração de proteínas proporcionou um rendimento de 5,68% e purificação de 3,8 vezes no processo descrito no presente trabalho. A precipitação de proteínas utilizando sulfato de amônio foi utilizada para a obtenção das proteases alcalinas dos peixes *Caranx hippos* (COSTA et al., 2013), *Sardinela aurita* (BEN KHALED et al., 2011), *Epinephelus coioides* (LIU et al., 2012) e *Oreochromis niloticus* (UNAJAC et al., 2012), esses dados corroboram que a precipitação por sulfato de amônio foi imprescindível para obtenção da F20-80% que apresentou uma atividade proteolítica significativa e por isso, escolhido para o restante do experimento.

**Figura 6.** Extrato Bruto centrifugado extraído de vísceras de *Caranx latus*



Fonte: Sebastião 2023

## 4.2. Efeitos do pH sobre a atividade proteolítica

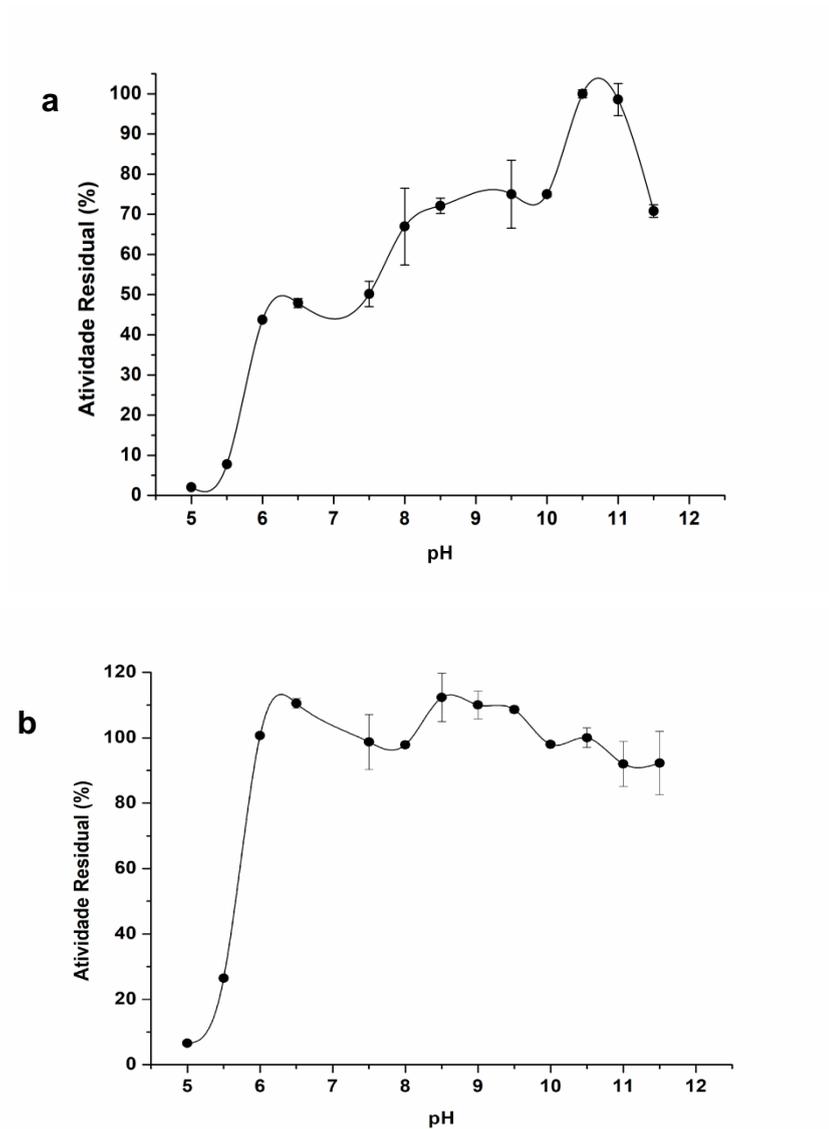
O pH ótimo encontrado para a F20-80% foi 10,5 (Figura 7a), resultado semelhante foi encontrado para peixe tambaqui (ESPÓSITO et al., 2009). Enquanto UNAJAK et al. (2012) e FREITAS-JÚNIOR et al. (2012) reportaram o pH ótimo 9,0 para a tripsina purificada dos peixes Tilápia do Nilo e pirarucu, respectivamente. Valores abaixo do encontrado no presente trabalho foram reportados por KANNO et al. (2010) com pH 8,5, COSTA et al. (2013) trabalhando com tripsina de ceco pilórico de xaréu encontraram pH ótimo 8,0; SILVA et al. (2011) encontraram pH 8,5 para tripsinas de ceco pilórico e intestino do peixe carapeba. VILLALBA-VILLALBA et al. (2013) estudaram tripsina de bagre vermiculado, e encontraram pH 9,5; além de proteases alcalinas de resíduos de pescados estudadas por Saranya et al. (2018) que apresentaram pH ótimo 7,0.

A F20-80% foi estável na faixa de pH alcalino e manteve acima de 98% da sua atividade enzimática em pH 11,0 durante 30 min de incubação. Além disso, foi observado que na faixa de pH 6,0-11,5, a atividade trípica presente foi acima de 90% (Figura 7b). Resultados semelhantes foram reportados para proteases alcalinas de *Gadus morhua* (pH 6,0-9,0) (SANDHOLT et al., 2018); *Thunnus alalunga* (pH 6-11) (POONSIN et al., 2019); *Sardinella aurita* (pH 7,0-11,0) (BEN KHALED et al., 2011); *Caranx hippos* (pH 7,0-10) (COSTA, et al; 2013); proteases alcalinas dos peixes *Cynoscion guatucupa*, *Merluccius hubbsi*, *Percophis brasiliensis* e *Urophycis brasiliensis* (pHs 7,0-11,5) (FRIEDMAN, et al, 2022); e *Tribolodon hakonensis* (pH 6,0-11) (KANNO et al, 2019). As alterações que ocorrem na conformação da proteína devido a repulsão da carga podem ser responsáveis pela perda de atividade enzimática em valores de pH fora da faixa determinada (VODJANI, 1961). De acordo com VILLALBA-VILLALBA et al. (2013) o incremento de cargas positivas em pH baixo desestabiliza a enzima alcalina desnaturando assim a sua estrutura terciária.

A apresentação de pH ótimo 10,5 da F20-80% e com estabilidade na mesma faixa de alcalinidade, e mantendo mais de 98% da sua atividade durante os 30 min de incubação torna-a um possível candidato para fins industriais que exigem alcalinidade de pH elevada. Achados estes sugerem que proteases como tripsina extraídas de vísceras de peixes podem ser excelentes candidatos para uso em processos industriais que requerem alcalinidade de pH e estabilidade em pH elevado podem servir de aditivos em inúmeros processos. A estabilidade é um parâmetro chave que juntamente com outros parâmetros determinam a viabilidade prática da

aplicação de uma enzima em um processo industrial (SANDHOLT, et al, 2019).

**Figura 7.** pH ótimo e estabilidade da F20-80% extraída de ceco pilórico de xerelete (*Caranx latus*) ao pH.



a) pH ótimo.

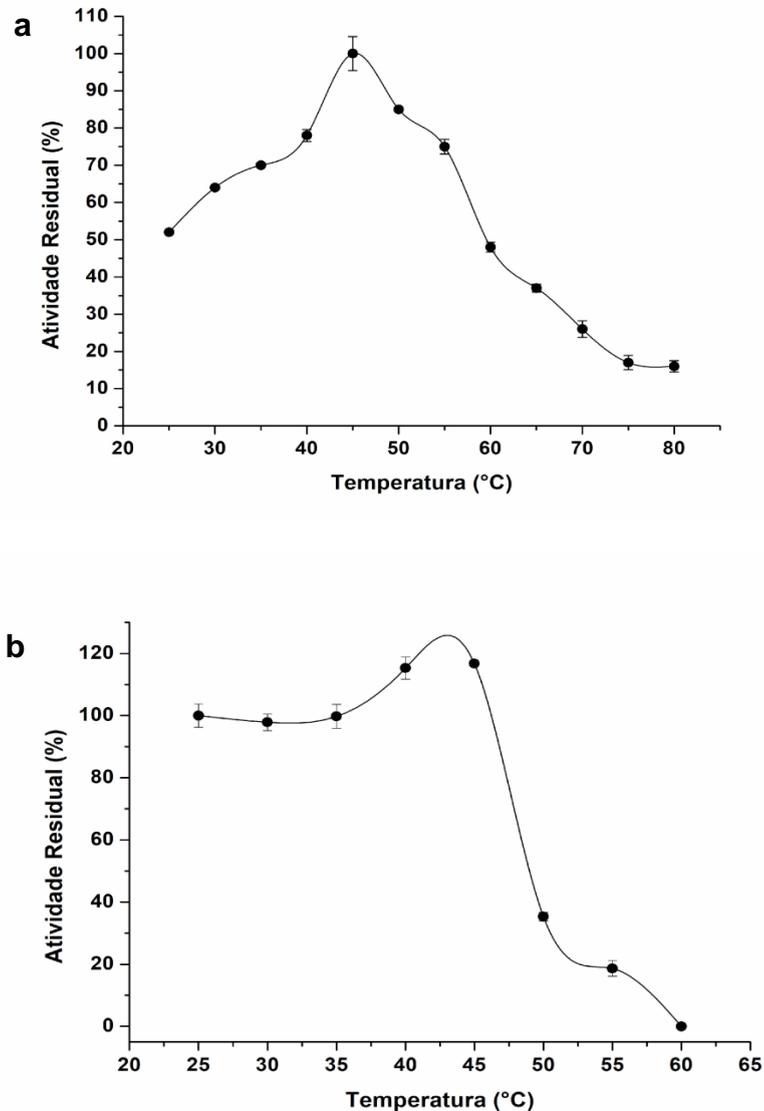
b) b) estabilidade ao pH da F20-80%.

Barras representam o desvio padrão (n=3).

#### 4.3. Efeitos de temperatura sobre a atividade proteolítica e estabilidade térmica

A temperatura ótima encontrada para a F 20-80% obtida a partir do ceco pilórico do *Caranx latus* foi 45°C (Figura 8.a), resultado semelhante foi encontrado para proteases extraídas do intestino e ceco pilórico da espécie de peixe *Lutjanus synagris* (ESPÓSITO et al., 2010). No entanto, foi observado que entre as temperaturas de 35-55°C a atividade trípica da F20-80% se manteve em até 70% após a incubação por 10 minutos, sugerindo que tripsinas presente na F20-80% é termotolerante (Figura 6a) ao apresentar mais da metade da sua atividade enzimática total nas faixas fora da sua temperatura ótima. A estabilidade térmica avaliada demonstrou que a F20-80% manteve acima de 97% da atividade residual na faixa de temperatura de 25-45°C durante 30 minutos, conforme a Figura 8 (b). Estabilidade em temperatura de 45°C também foi relatado para proteases de vísceras de outros peixes como ariocó (ESPÓSITO et al., 2010) e pargo amarelo (NAMJOU et al., 2019). Já Poonsin et al. (2019) encontraram estabilidade térmica da tripsina estudada na faixa de 20-50°C, dentro do observado no presente estudo. Unajak et al. (2012) encontraram temperatura ótima na faixa de 55-60°C para a tripsina purificada do intestino de tilápia do Nilo. Freitas Júnior et al. (2012) descreveram a temperatura ótima da tripsina purificada do peixe pirarucu (*Arapaima gigas*) de 65°C, e termoestabilidade na faixa de temperatura de 25-55°C por 30 minutos. Kanno et al. (2010) reportaram a temperatura ótima de 60°C. A manutenção de 100% da atividade enzimática a 45°C por 30 min sugere que a protease alcalina obtida pode ser considerada termoestável.

**Figura 8.** Temperatura ótima e estabilidade termica da F20-80% obtida a partir das vísceras do xerelete (*Caranx latus*).



(a) Temperatura ótima por 10 min. (b) estabilidade térmica por 30 min. Barras representam o desvio padrão (n=3).

#### 4.4. Efeito de íons metálicos e inibidores específicos

Os íons  $\text{Al}^{3+}$ ,  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Hg}^{2+}$  e  $\text{Zn}^{2+}$  promoveram uma forte inibição na atividade trípica de F20-80% (Tabela 2). Resultados semelhantes utilizando o BApNA foram observados para as tripsinas de outras espécies de peixe como *L. synagris* (ESPÓSITO et al., 2010), *D. rhombeus* (SILVA et al., 2011), *C. hippos* (COSTA et al., 2013) e *A. gigas* (FREITAS-JÚNIOR et al., 2012). A atividade trípica de F20-80% também apresentou uma leve inibição na presença de

Ca<sup>2+</sup> utilizando o BApNA como substrato. Freitas-Júnior et al. (2021) reportaram que a tripsina de *A. gigas* apresentou resultados diferentes para o efeito do Ca<sup>2+</sup>, um conhecido ativador de tripsinas de mamíferos, quando substratos sintéticos diferentes foram utilizados, sendo apresentada uma discreta inibição por esse íon quando o BApNA foi utilizado em detrimento de uma forte ativação pelo mesmo íon quando o carbobenzoxi-Phe-Arg-7-amido-4-metilcumarina foi usado como substrato. SARANYA e JAYAPRIYA (2018) observaram que uma protease alcalina obtida de resíduos de peixes não identificados foram inibidas por Mg<sup>2+</sup>, Al<sup>3+</sup> e Ca<sup>2+</sup>, quando o substrato natural caseína foi utilizado.

A atividade trípica de F20-80% foi fortemente inibida por TLCK, um inibidor específico de tripsina de mamíferos. Resultados similares foram reportados por Espósito et al. (2010), Silva et al. (2011), Costa et al. (2013), Klomklao e Benjakul (2018), Poonsin et al. (2019) para tripsinas extraídas de vísceras de peixes marinhos. A inibição por TLCK confirma a presença de enzimas do tipo tripsina símile no ceco pilórico de *C. latius*. O fato de não ter sido observada uma forte inibição na presença de EDTA sugere que as tripsinas presentes em F20-80% não dependem de íons metálicos como cofatores. Resultados similares foram observados para tripsina de *C. hippos* (COSTA et al., 2013), *Lutjanus analis* (MEDEIROS et al., 2015), *D. rhombeus* (SILVA et al., 2011), *P. disjunctivus* (VILLALBA-VILLALBA et al., 2013), e *T. hakonensis* (Kanno et al., 2019). Na presença do inibidor específico de quimotripsina (TPCK) a F20-80% também teve sua atividade trípica levemente inibida, resultado similar foi encontrado por BOUGATEF et al. (2010) para a tripsina de *Mustelus mustelus*.

**Tabela 2.** Efeito de íons metálicos e inibidores de proteases na atividade da F20-80% extraída de ceco pilórico de xerelete (*Caranx latus*)

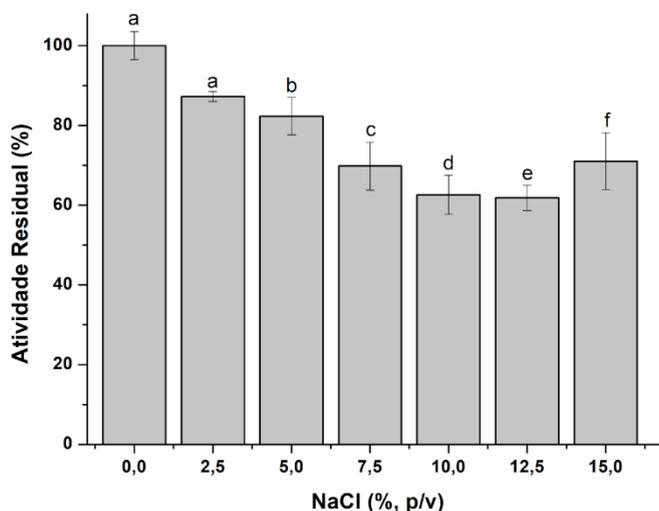
Cloretos e Agentes Químicos	Atividade Residual (%)
Controle*	100 ± 2,18 <sup>a</sup>
<b>Sais (0,01 M)</b>	
AlCl <sub>3</sub>	1,94 ± 0,17 <sup>b</sup>
CaCl <sub>2</sub>	90,2 ± 3,45 <sup>h</sup>
CdCl <sub>2</sub>	96,8 ± 5,10 <sup>a</sup>
CuCl <sub>2</sub>	4,55 ± 0,32 <sup>e</sup>
HgCl <sub>2</sub>	18,03 ± 1,85 <sup>d</sup>
KCl	93,91 ± 4,06 <sup>a</sup>
MgCl <sub>2</sub>	91,45 ± 0,21 <sup>c</sup>
PbCl <sub>2</sub>	80,72 ± 4,61 <sup>f</sup>
ZnCl <sub>2</sub>	65,08 ± 2,04 <sup>g</sup>
<b>Agentes Químicos (1 mM)</b>	
EDTA (1mM)	86,85 ± 0,89 <sup>i</sup>
TLCK (1mM)	1,88 ± 0,06 <sup>j</sup>
TPCK (1Mm)	78,47 ± 6,42 <sup>k</sup>

Os resultados foram representados por média ± desvio padrão. \*Atividade sem íon ou inibidor. Letras sobrescritas diferentes significam diferenças estatísticas em relação ao controle segundo o teste Tukey ( $p < 0.05$ ,  $n = 3$ ). Fonte: Autora (2023).

#### 4.5. Efeito de NaCl sobre a F20-80%

O efeito de NaCl sobre a F20-80% está mostrado na Figura 9. A F20-80% manteve 70% de sua atividade máxima na presença de 7,5% (m/v) de NaCl. Muito embora a adição de NaCl em concentrações maiores diminui ainda que gradualmente a atividade da F20-80% ela ainda manteve sua atividade enzimática acima da metade da sua atividade máxima. Estudos demonstram que proteases alcalinas do tipo tripsina-símile de algumas espécies de peixes carnívoros apresentam atividade elevada em concentrações altas de NaCl (BOUGATEF et al., 2010; KLOMKLAO e BENJAKUL, 2018). A redução da atividade enzimática frente a elevadas concentrações de sal pode ser causada pela precipitação da proteína devido a sua ligação com as moléculas de água resultando num efeito de *salting-out* de acordo com LIU et al. (2011) (apud VODJANI, 1996). A F20-80% pode servir para aplicações industriais do ramo alimentício que requerem ação enzimática da tripsina e certas condições de salinidade para preservação dos alimentos.

**Figura 9.** Efeito da concentração de NaCl sobre a atividade trípica presente na F20-80% obtida a partir do ceco pilórico do xerelete (*Caranx latus*).



Barras representam o desvio padrão. Letras diferentes significam diferenças estatísticas em relação ao controle segundo o teste Tukey ( $p < 0,05$ ,  $n = 3$ ).

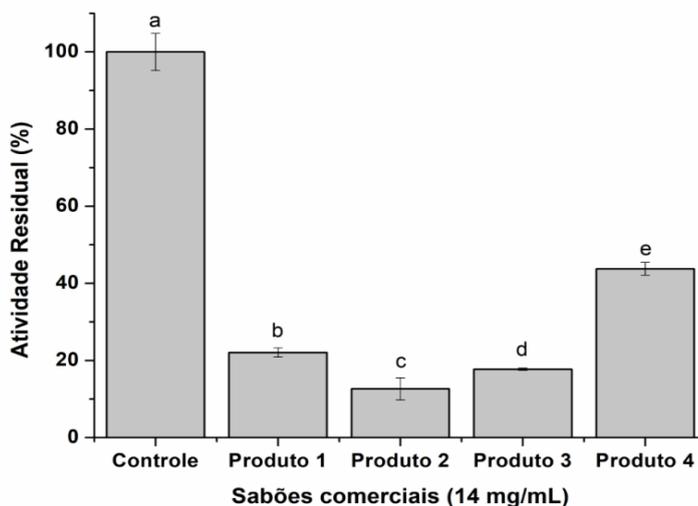
#### 4.6. Parâmetros cinéticos

A constante de Michaelis–Menten ( $K_m$ ) e a Velocidade Máxima ( $V_{max}$ ) da tripsina presente na F20-80% foi determinada utilizando BApNA com substrato. O  $K_m$  e  $V_{max}$  encontrados foram de  $0,900 \pm 0,145$  mM e  $32,52 \pm 1,69$  ( $\mu\text{mol/s}$ ), respectivamente.  $K_m$  é a concentração de substrato na qual é alcançada metade da velocidade máxima ( $1/2 V_{max}$ ) e reflete a afinidade da enzima ao substrato. O resultado encontrado indica uma alta afinidade da tripsina presente na F20-80% ao substrato BApNA. Resultados similares foram encontrados para as tripsinas purificadas a partir das vísceras digestivas dos peixes *Sardinelle aurita* (BEN KHALED et al., 2011), *Pseudupeneus maculatus* (Souza et al., 2007), *Engraulis encrasicolus* (MARTINEZ et al., 1988), e também similar a uma tripsina suína (OUTZEN et al., 1996). Tripsinas purificadas de outras espécies de peixes como *Caranx hippos* (COSTA et al., 2013), *Arapaima gigas* FREITAS-JÚNIOR et al., 2012), *Diapterus rhombeus* (SILVA, et al; 2011), *Lutjanus synagris* (ESPÓSITO et al., 2010), *Lutjanus vitta* (KHANTAPHANT e BENJAKUL, 2010), *Oreochromis niloticus* (BEZERRA et al., 2005), e inclusive uma tripsina bovina (ASGEIRSSON et al., 1989) apresentaram  $K_m$  menores que o reportado no presente trabalho.

#### 4.7. Compatibilidade com detergentes comerciais

A compatibilidade da F20-80% com a formulação de quatro marcas de sabões comerciais sólidos foi testada e os resultados estão mostrados na Figura 10. A F20-80% apresentou atividade residual de  $43,77 \pm 1,65\%$  com o detergente Produto 4. Para as marcas de detergentes Produto 1, Produto 2, e Produto 3 os valores encontrados de atividade residual da F20-80% foram de 12 - 22% após 105 minutos de reação. Os resultados acima reportados demonstram que a F20-80% não foi compatível com a formulação dos detergentes comerciais em pó testados.

**Figura 10.** Compatibilidade da F20-80% de xerelete (*Caranx latus*) com detergentes comerciais



Controle: atividade proteolítica na ausência de detergentes comerciais. Barras representam o desvio padrão. Letras diferentes significam diferenças estatísticas em relação ao controle segundo o teste Tukey ( $p < 0.05$ ,  $n = 3$ ).

Dos quatro detergentes testados, o Produto 4 possui menos ingredientes na sua composição comparado aos demais utilizados no presente trabalho, e além disso apresentou pH 7,5 que é menos alcalino comparado aos outros produtos que apresentaram pH 11,0 (Produtos 1 e 2) e pH 10,5 (Produto 3). O melhor resultado observado utilizando o Produto 4 pode estar associado à sua composição e não ao pH já que o pH ótimo da atividade trípica da

F20-80 foi pH 10,5 mais próximos aos pHs observados para os outros detergentes.

As enzimas proteolíticas para serem incorporadas nas formulações dos detergentes devem exibir estabilidade e atividade em pH e temperatura elevados, além de sua estabilidade com compostos detergentes como surfactantes e agentes oxidantes, pois o pH dos detergentes geralmente flutua entre 9-12 (YOUNES et al., 2015). A F20-80% muito embora tenha apresentado estabilidade na faixa de pH 6-11,5 e ter se mostrado estável durante o armazenamento não teve compatibilidade com os detergentes comerciais testados. Pois para ser uma ótima enzima detergente é necessário que apresente estabilidade durante o armazenamento e também ser capaz de apresentar atividade durante a lavagem por um período extenso de tempo na solução (NASRI et al., 2015; ESPÓSITO et al., 2009). Além de apresentar eficácia ao manter em até 100% de suas atividades a 30 °C, porcentagem que pode variar dependendo do pH, da natureza e nível de cada composto presente na solução (NASRI, et al, 2015).

## 5. CONCLUSÃO

As vísceras do peixe *Caranx latus* podem ser promissoras fontes de proteínas alcalinas com aplicações industriais variadas nas quais exigem termoestabilidade, estabilidade em pHs e elevadas concentrações de NaCl. O presente estudo sugere que a atividade catalítica observada para a F20-80% se trata de uma atividade enzimática da tripsina-símile. Conclui-se que estudos detalhados de outros parâmetros bioquímicos são necessários para confirmação do tipo de enzima, além da avaliação em variadas aplicações industriais, visto que só foi testado neste estudo uma única possível aplicação.

## 6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ACCUMANNO G.M.; RICHARDS V.A.; GUNTHER N.W.; HICKEY M.E.; LEE J.L. Purification and characterization of the thermostable protease produced by *Serratia grimesii* isolated from channel catfish. **Journal of Science Food and Agriculture**. 99(5), p. 2428-2437, 2019. doi:10.1002/jsfa.9451.

ÁGEIRSSON, B., FOX, J.W. and BJARNASON, J.B. Purification and characterization of trypsin from the poikilotherm *Gadus morhua*. **European Journal of Biochemistry**, 180: 85-94, 1989. doi.org/10.1111/j.1432-1033.1989.tb14618.x.

AHMED SA, TAIE HAA, ABDEL WAHAB WA. Antioxidant capacity and antitumor activity of the bioactive protein prepared from orange peel residues as a by-product using fungal protease. **Internatinal Journal of Biological Macromolecules**, v. 15, p. 234:123578, 2023. doi:10.1016/j.ijbiomac.2023.123578.

AQUAMAPS . Mapas de distribuição gerados por computador para *Caranx latus* (Jack-olho-de-cavalo), com mapa de distribuição nativa do ano 2050 modelado com base no cenário de emissões IPCC RCP8.5. Obtido em <https://www.aquamaps.org>. Acesso em 11 de agosto de 2023.

BRACHT, A.; ISHII-IWAMOTO, E. L. Métodos de Laboratório em Bioquímica. Barueri: **Manole**, p. 77-207, 2002.

BEN KHALED H, JELLOULI K, SOUISSI N, GHORBEL S, BARKIA A, NASRI M. Purification and characterization of three trypsin isoforms from viscera of sardinelle (*Sardinella aurita*). **Fish Physiology and Biochemistry**, v. 37(1), p. 123-33, 2011. doi: 10.1007/s10695-010-9424-5. Epub 2010 Aug 14. PMID: 20711672.

BEZERRA, R. S., LINS, E. J. F., ALENCAR, R. B., PAIVA, P. M. G., CHAVES, M. E. C., COELHO, L. C. B. B., CARVALHO, L.B. Alkaline proteinase from intestine of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). **Process Biochemistry**, v. 40, p. 1829–1834, 2005. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2004.06.066>.

BOUGATEF, A., SOUISSI, N., FAKHFAKH, N., ELLOUZ-TRIKI, Y., & NASRI, M.. Purification and characterization of trypsin from the viscera of sardine (*Sardina pilchardus*). **Food Chemistry**, v. 102, p. 343-350, 2007.

BOUGATEF A, BALTI R, NASRI R, JELLOULI K, SOUISSI N, NASRI M. 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. doi:10.1021/jf100534a.

BUAMARD N, ALUKO RE, BENJAKUL S. Stability of tuna trypsin-loaded alginate-chitosan beads in acidic stomach fluid and the release of active enzyme in a simulated intestinal tract environment. **Food Biochemistry**, v. 44, n. 11, p. e13455, 2020. doi: 10.1111/jfbc.13455.

CARDOSO DOS SANTOS, D. M. R; SANTOS, C. W. V; SOUZA, C. B; ALBUQUERQUE, F. S; OLIVEIRA, J. M. S; PEREIRA, H. J. V. Trypsin purified from *Coryphaena hippurus* (common dolphinfish): Purification, characterization, and application in commercial detergents. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 25, p. 101584, 2020. doi.org/10.1016/j.bcab.2020.101584.

CARRETAS-VALDEZ MI, CINCO-MOROYOQUI FJ, EZQUERRA-BRAUER MJ, MARQUEZ-RIOS E, QUINTERO-REYES IE, LOPEZ-ZAVALA AA, ARVIZU-FLORES AA. Refolding and Activation from Bacterial Inclusion Bodies of Trypsin I from Sardine (*Sardinops sagax caerulea*). **Protein and Peptide Letters**, v. 26, p. 170-175, 2019. doi: 10.2174/0929866525666181019161114.

CASTRO-CESEÑA AB, DEL PILAR SÁNCHEZ-SAAVEDRA M, MÁRQUEZ-ROCHA FJ. Characterisation and partial purification of proteolytic enzymes from sardine by-products to obtain concentrated hydrolysates. **Food Chemistry**, v.135, n.2, p. 583-589, 2012. doi: 10.1016/j.foodchem.2012.05.024.

CASTILLO-YÁÑEZ FJ, PACHECO-AGUILAR R, GARCÍA-CARREÑO FL, NAVARRETE-DEL TORO MDE L. Isolation and characterization of trypsin from pyloric caeca of Monterey sardine *Sardinops sagax caerulea*. **Comparative Biochemistry and Physiology, Part B. Biochemical and Molecular Biology**, v. 140, n.1, p. 91- 98, 2005. doi:10.1016/j.cbpc.2004.09.031

CHATTERJEE J, GIRI S, MAITY S, SINHA A, RANJAN A, RAJSHEKHAR, GUPTA S. Production and characterization of thermostable alkaline protease of *Bacillus subtilis* (ATCC

6633) from optimized solid-state fermentation. **Biotechnology and Applied Biochemistry**, v. 62, n. 5, p. 709-718, 2015. doi: 10.1002/bab.1309.

COSTA, H.M., FREITAS JÚNIOR, A.C., AMARAL, I.P.G. HIDRATA, I.Y., PAIVA, P.M.G., CARVALHO, 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, 2013. doi.org/10.1186/1752-153X-7-166.

CHUNG D, YU WJ, LIM JY, KANG NS, KWON YM, CHOI G, BAE SS, CHO K, LEE DS. Characterization of the Proteolytic Activity of a Halophilic *Aspergillus reticulatus* Strain SK1-1 Isolated from a Solar Saltern. **Microorganisms**, v. 10, n. 1, p. 29, 2021. doi: 10.3390/microorganisms10010029.

DE OLIVEIRA JM, FERNANDES P, BENEVIDES RG, DE ASSIS SA. Characterization and immobilization of protease secreted by the fungus *Moorella speciosa*. **3 Biotech**, v. 10, n. 10, p. 419, 2020. doi: 10.1007/s13205-020-02412-0.

DE OLIVEIRA JM, FERNANDES P, BENEVIDES RG, DE ASSIS SA. Production, characterization, and immobilization of protease from the yeast *Rhodotorula oryzoicola*. **Biotechnology and Applied Biochemistry**, v. 68, n. 5, p. 1033-1043, 2021. doi: 10.1002/bab.2023.

EMON TH, HAKIM A, CHAKRABORTHY D, BHUYAN FR, IQBAL A, HASAN M, AUNKOR TH, AZAD AK. Kinetics, detergent compatibility and feather-degrading capability of alkaline protease from *Bacillus subtilis* AKAL7 and *Exiguobacterium indicum* AKAL11 produced with fermentation of organic municipal solid wastes. **Journal of Environmental Science and Health. Part A, Toxic/hazardous substances and environmental engineering**, v. 55, n. 11, p. 1339-1348, 2020. doi: 10.1080/10934529.2020.1794207.

ESPÓSITO, T. S., AMARAL, I. P. G., BUARQUE, D. S., OLIVEIRA, G. B., CARVALHO, L. B., & BEZERRA, R. S. Fish processing waste as a source of alkaline proteases for laundry detergent. **Food Chemistry**, v. 112, n. 1, p. 125–130, 2009. doi:10.1016/j.foodchem.2008.05.049.

ESPÓSITO, T. S., MARCUSCHI, M., AMARAL, I. P. G., CARVALHO, 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, n. 10, p. 6433–6439, 2010. doi:10.1021/jf100111e.  
FAO. The State of World Fisheries and Aquaculture 2020. **Sustainability in action**. Rome, 2020. doi.org/10.4060/ca9231en.

FAO. The State of World Fisheries and Aquaculture 2022. **Towards Blue Transformation**. Rome, 2022. doi.org/10.4060/cc0461en.

FAHMY, N.M., EL-DEEB, B. Optimization, partial purification, and characterization of a novel high molecular weight alkaline protease produced by *Halobacillus* sp. HAL1 using fish wastes as a substrate. **Journal of Genetic Engineering and Biotechnology**, v. 21, p. 48, 2023. <https://doi.org/10.1186/s43141-023-00509-6>.

FAN HY, DUMONT MJ, SIMPSON BK. Preparation and physicochemical characterization of films prepared with salmon skin gelatin extracted by a trypsin-aided process. **Current Research in Food Science**, v.17, n. 3, p. 146-157, 2020. doi: 10.1016/j.crfs.2020.04.002.

FEITOZA, B.M., ROSA,R.S e ROCHA, L.A. Ecology and zoogeography of deep-reef fishes in Northeastern Brazil. **Bulletin of Marine Science**, v. 76, n. 3, p. 725-742, 2005.

FLOETER, S. R.; GASPARINI J. L.; ROCHA L. A.; FERREIRA C. E. L.; RANGEL C. A.; FEITOZA B. M. **Brazilian reef fish fauna: checklist and remarks**. 2003.

FRIEDMAN IS, BEHRENS LA, PEREIRA NLA, CONTRERAS EM, FERNÁNDEZ-GIMENEZ AV. Digestive proteinases from the marine fish processing wastes of the South-West Atlantic Ocean: Their partial characterization and comparison. **Journal of Fish Biology**, v. 100, n. 1, p. 150-160, 2022. doi: 10.1111/jfb.14929.

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. doi :10.1016/j.foodchem.2012.02.056.

FREITAS-JÚNIOR, A. C. V; COSTA, H. M.S; MARCUSCHI, M.; ICIMOTO, M. Y; MACHADO, M. F.; MACHADO, M. F. M. FERREIRA, J. C.; OLIVEIRA, V. M. S. B. B.; BUARQUE, D. S.; BEZERRA, R. S. Substrate specificity, physicochemical and kinetic properties of a trypsin from the giant Amazonian fish pirarucu (*Arapaima gigas*). **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 102073, 2021 . doi:10.1016/j.bcab.2021.102073.

FUCHISE, T., KISHIMURA, H., SEKIZAKI, H., NONAMI, Y., KANNO, G., KLOMKLAO, S., CHUN, B.-S. Purification and characteristics of trypsins from cold-zone fish, Pacific cod

(*Gadus macrocephalus*) and saffron cod (*Eleginus gracilis*). **Food Chemistry**, v. 116,n. 3, p. 611–616, 2009. doi:10.1016/j.foodchem.2009.02.078.

IBARRA-GARCÍA LE, TOVAR-RAMÍREZ D, ROSAS C, CAMPA-CÓRDOVA ÁI, MAZÓN-SUÁSTEGUI JM. Digestive enzymes of the Californian two-spot octopus, *Octopus bimaculoides* (Pickford and McConnaughey, 1949). **Comparative Biochemistry and Physiology. Part B, Biochemistry and Molecular Biology**, v. 215, p. 10- 18, 2018. doi:10.1016/j.cbpb.2017.10.001.

KHANGEMBAM BK, CHAKRABARTI R. Trypsin from the digestive system of carp *Cirrhinus mrigala*: purification, characterization and its potential application. **Food Chemistry**, v. 175, p. 386-394, 2015. doi:10.1016/j.foodchem.2014.11.140.

KHANTAPHANT, S; BENJAKUL, S. Purification and characterization of trypsin from the pyloric caeca of brownstripe red snapper (*Lutjanus vitta*). **Food Chemistry**, v. 120, 2010 658–664 doi:10.1016/j.foodchem.2009.09.098.

KANNO G, KLOMKLAO S, KUMAGAI Y, KISHIMURA H. A thermostable trypsin from freshwater fish Japanese dace (*Tribolodon hakonensis*): a comparison of the primary structures among fish trypsins. **Fish Physiology and Biochemistry**, v. 45, n. 2, p. 561-571, 2019. doi:10.1007/s10695- 018-0600-3.

KANNO G, YAMAGUCHI T, KISHIMURA H, YAMAHA E, SAEKI H. Purification and characteristics of trypsin from masu salmon (*Oncorhynchus masou*) cultured in fresh water. **Fish Physiology and Biochemistry**, v. 36, n. 3, p. 637-645, 2010. doi:10.1007/s10695-009-9336-4.

KTARI, N., BEN KHALED, H., NASRI, R., JELLOULI, K., GHORBEL, S., NASRI, M. Trypsin from zebra blenny (*Salaria basilisca*) viscera: purification, characterisation and potential application as a detergent additive. **Food Chemistry**, v. 130, p. 467–474, 2012. doi.org/10.1016/j.foodchem.2011.07.015.

KISHIMURA, H; KLOMKLAO, S; BENJAKUL, S; CHUN, BS. Characteristics of trypsin from the pyloric ceca of walleye pollock (*Theragra chalcogramma*). **Food Chemistry**, v. 106, n. 1, p. 194-199, 2008. doi.org/10.1016/j.foodchem.2007.05.056.

KLOMKLAO S, BENJAKUL S. Two trypsin isoforms from albacore tuna (*Thunnus alalunga*) liver: Purification and physicochemical and biochemical characterization. **International Journal of Biological Macromolecules**, 2018 Feb;107(Pt B):1864-1870. doi:

10.1016/j.ijbiomac.2017.10.059.

KUMAR, A. *Aspergillus nidulans*: A Potential Resource of the Production of the Native and Heterologous Enzymes for Industrial Applications. **International Journal of Microbiology**, v. 2020, 2020. doi.org/10.1155/2020/8894215.

LIU JY, YOSHIDA A, GAO YL, SHIROTA K, SHIINA Y, NOGUCHI E, KUWAHARA K, OSATOMI K. Purification and characterization of a sarcoplasmic serine proteinase from threadfin bream *Nemipterus virgatus* muscle. **Food Chemistry**, v.284, p. 198-204, 2019. doi: 10.1016/j.foodchem.2019.01.024.

LIU CH, SHIU YL, HSU JL. Purification and characterization of trypsin from the pyloric ceca of orange-spotted grouper, *Epinephelus coioides*. **Fish Physiology and Biochemistry**, v. 38, n. 3, p. 837-848, 2012. doi: 10.1007/s10695-011-9571-3.

MATKAWALA F, NIGHOJKAR S, KUMAR A, NIGHOJKAR A. Microbial alkaline serine proteases: Production, properties and applications. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 37, n. 4, p. 63, 2021. doi: 10.1007/s11274-021-03036-z.

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

MEDEIROS FS, MARCUSCHI M, ASSIS CRD, SILVA JF, ESPÓSITO TS, BEZERRA RS. Potential laundry detergent applications of mutton snapper (*lutjanus analis*) proteases. **Journal of Fisheries Sciences.com** v. 9, n. 3, p. 063-069, 2015.

MECHRI S, BOUACEM K, ZARAÏ JAOUADI N, REKIK H, BEN ELHOUL M, OMRANE BENMRAD M, HACENE H, BEJAR S, BOUANANE-DARENFED A, JAOUADI B. Identification of a novel protease from the thermophilic *Anoxybacillus kamchatkensis* MIV and its application as laundry detergent additive. **Extremophiles**, v. 23, n. 6, p. 687-706, 2019. doi: 10.1007/s00792-019-01123-6.

NAMJOU F, YEGANEH S, MADANI R, OURAJI H. Extraction, Purification, and Characterization of Trypsin Obtained from the Digestive System of Yellowfin Seabream (*Acanthopagrus latus*). **Archive of Razi Institute**, v. 74, n. 4, p. 405-411. doi: 10.22092/ari.2018.122854.1229. Epub 2019 Dec 1. PMID: 31939257.

NASRI, R., ABED, H., KARRA-CHÂABOUNI, M., NASRI, M., & BOUGATEF, A. Digestive alkaline proteinases from *Serranus scriba* viscera: Characteristics, application in the

extraction of carotenoproteins from shrimp waste, and evaluation in laundry commercial detergents. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 4, n. 3, p. 355– 361, 2015. doi:10.1016/j.bcab.2015.05.001.

NELSON, DAVID, L. E MICHAEL M. COX. **Princípios de bioquímica de Lehninger**. 7 ed. –Porto Alegre : Artmed, 2019.

OMRANE BENMRAD M, MECHRI S, ZARAÏ JAOUADI N, BEN ELHOUL M, REKIK H, SAYADI S, BEJAR S, KECHAOU N, JAOUADI B. Purification and biochemical characterization of a novel thermostable protease from the oyster mushroom *Pleurotus sajor-caju* strain CTM10057 with industrial interest. **BMC Biotechnol**, v. 19, n. 1, p. 43, 2019. doi: 10.1186/s12896-019-0536-4.

OUELHADJ A, BOUACEM K, ASMANI KL, ALLALA F, MECHRI S, YAHIAOUI M, JAOUADI B. Identification and homology modeling of a new biotechnologically compatible serine alkaline protease from moderately halotolerant *Gracilibacillus boraciitolerans* strain LO15. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 161, p. 1456-1469, 2020. doi: 10.1016/j.ijbiomac.2020.07.266.

OUTZEN H, BERGLUND GI, SMALÄS AO, WILLASSEN NP. Temperature and pH sensitivity of trypsins from Atlantic salmon (*Salmo salar*) in comparison with bovine and porcine trypsin. **Comparative Biochemistry and Physiology. Part B, Biochemistry & Molecular Biology**, v.115, n. 1, p. 33-45, 1996. doi: 10.1016/0305-0491(96)00081-8.

PATCHIMPET, J; SANGKHARAK, K; KLOMKLAO, S. Lipolytic activity of viscera extract from three freshwater fish species in Phatthalung, Thailand: Comparative studies and potential use as dishwashing detergent additive. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 19, p. 101143, 2019. doi.org/10.1016/j.bcab.2019.101143.

PANDEY GR, SHRESTHA A, KARKI TB, NEUPANE S, OJHA S, KOIRALA P, TIMILSINA PM. Screening and Identification of Thermotolerant and Osmotolerant *Bacillus amyloliquefaciens* BKHE Isolated from Kinema of Eastern Nepal for Alkaline Protease Production. **International Journal Microbiol**, v. 2022, p. 6831092, 2022. doi: 10.1155/2022/6831092.

PRASAD S, ROY I. Converting Enzymes into Tools of Industrial Importance. **Recent Patent of Biotechnology**, v. 12, n. 1, p. 33-56, 2018. doi:10.2174/1872208311666170612113303.

POONSIN, T.; SIMPSON, B.; BENJAKUL, S.; VISESSANGUAN, W.; YOSHIDA, A.; OSATOMI, K.; KLOMKLAO, S. Anionic trypsin from the spleen of albacore tuna (*Thunnus alalunga*): Purification, biochemical properties and its application for proteolytic degradation of fish muscle. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 133, p. 971-979, 2019a. doi: 10.1016/j.ijbiomac.2019.04.122.

POONSIN, T.; SIMPSON, B.; BENJAKUL, S.; VISESSANGUAN, W.; YOSHIDA, A.; KLOMKLAO, S. *Albacore tuna* spleen trypsin: Potential application as laundry detergent additive and in carotenoprotein extraction from Pacific white shrimp shells. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 17, p. 638-646, 2019b.

RAMKUMAR, A., SIVAKUMAR, N., GUJARATHI, A.M and VICTOR, R. Production of thermotolerant, detergent stable alkaline protease using the gut waste of *Sardinella longiceps* as a substrate: Optimization and characterization. **Scientific Reports**, v. 8, p. 12442, 2018. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-30155-9>.

ROMANELLI, C., COOPER, D., CAMPBELL-LENDRUM, D., MAIERO, M., KARESH, W. B., HUNTER, D., & GOLDEN, C. D. (2015). Connecting global priorities: biodiversity and human health: a state of knowledge review. **World Health Organization/Secretariat of the UN Convention on Biological Diversity**.

ROZANOV AS, SHEKHOVTSOV SV, BOGACHEVA NV, PERSHINA EG, RYAPOLOVA AV, BYTYAK DS, S E PELTEK. Production of subtilisin proteases in bacteria and yeast. **Vavilovskii Zhurnal Genet Seleksii**, v. 25, n. 1, p. 125-134, 2021. doi: 10.18699/VJ21.015.

SAE-LEAW T, BENJAKUL S. Lipase from liver of seabass (*Lates calcarifer*): Characteristics and the use for defatting of fish skin. **Food Chemistry**, v. 240, p. 9-15, 2018. doi:10.1016/j.foodchem.2017.07.089.

SANDHOLT GB, STEFANSSON B, SCHEVING R, GUDMUNDSDOTTIR Á. Biochemical characterization of a native group III trypsin ZT from Atlantic cod (*Gadus morhua*). **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 125, p. 847-855, 2019. doi:10.1016/j.ijbiomac.2018.12.099.

SARANYA, R., JAYAPRIYA, J.T.S.A. Purification, characterization, molecular modeling and docking study of fish waste protease. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 118, p. 569–583, 2018. doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2018.06.119.

SILVA, J.F. ESPÓSITO TS, MARCUSCHI M, RIBEIRO K, CAVALI R.O, OLIVEIRA V,

BEZERRA RS. Purification and partial characterisation of a trypsin from the processing waste of the silver mojarra (*Diapterus rhombeus*). **Food Chemistry**, v. 129, n. 3, p. 777-782, 2011. doi:10.1016/j.foodchem.2011.05.019.

SILVA J.A.F, SILVA M.K.S, SILVA T.A, COSTA L.D.A, LEAL M.L.E, BEZERRA R.S, COSTA H.M.S, FREITAS-JÚNIOR A.C.V. Obtainment and characterization of digestive aspartic proteases from the fish *Caranx hippos* (Linnaeus, 1766). **Brazilian Journal of Biology**, v. 82, p. 234500, 2021. doi: 10.1590/1519-6984.234500.

SILVA M.K.S, SILVA T.A, SILVA J.A.F, COSTA L.D.A, LEAL M.L.E, BEZERRA R.S, COSTA H.M.S, FREITAS-JÚNIOR A.C.V. *Carangoides bartholomaei* (Cuvier, 1833) stomach: a source of aspartic proteases for industrial and biotechnological applications. **Brazilian Journal of Biology**, v. 82, p. 234413, 2021. doi: 10.1590/1519-6984.234413.

SOUZA, A. A. G., AMARAL, I. P. G., SANTO, A. R. E., CARVALHO, L. B., & BEZERRA, R. S. Trypsin-like enzyme from intestine and pyloric caeca of spotted goatfish (*Pseudupeneus maculatus*). **Food Chemistry**, v. 100, p. 1429–1434, 2007. doi:10.1016/j.foodchem.2005.12.016.

UNITED NATIONS DEPARTMENT OF ECONOMIC AND SOCIAL AFFAIRS, POPULATION DIVISION. **World Population Prospects 2022: Summary of Results**, n. 3, 2022.

UNAJAK S, MEESAWAT P, PAEMANEE A, ET AL. Characterisation of thermostable trypsin and determination of trypsin isozymes from intestine of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus* L.). **Food Chemistry**, v. 134, n. 3, p. 1533-1541, 2012. doi:10.1016/j.foodchem.2012.03.074.

VILLALBA-VILLALBA AG, RAMÍREZ-SUÁREZ JC, VALENZUELA-SOTO EM, SÁNCHEZ GG, RUIZ GC, PACHECO-AGUILAR R. Trypsin from viscera of vermiculated sailfin catfish, *Pterygoplichthys disjunctivus*, Weber, 1991: its purification and characterization. **Food Chemistry**, v. 141, n. 2, p. 940-5, 2013. doi: 10.1016/j.foodchem.2013.03.078.

VOJDANI F: In *Methods of Testing Protein Functionality*. Edited by Hall GM. New York: **Chapman and Hall**; 1996:11–60.

WARBURG, O. AND W. CHRISTIAN. Isolation and crystallization of enolase. **Biochemische Zeitschrift**, v. 310, p. 384-421, 1942.

YANG S, ZHAI L, HUANG L, MENG D, LI J, HAO Z, GUAN Z, CAI Y, LIAO X. Mining of alkaline proteases from *Bacillus altitudinis* W3 for desensitization of milk proteins: Their heterologous expression, purification, and characterization. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 153, p. 1220-1230, 2020. doi: 10.1016/j.ijbiomac.2019.10.252.

YOUNES, I., NASRI, R., BKHAIRIA, I., JELLOULI, K., NASRI, M. New proteases extracted from red scorpionfish (*Scorpaena scrofa*) viscera: characterization and application as a detergent additive and for shrimp waste deproteinization. **Food and Bioprocess Processing**, v. 94, p. 453–462, 2015. <https://doi.org/10.1016/j.fbp.2014.06.003>.