



UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AQUICULTURA



CARACTERIZAÇÃO DE ENZIMAS DIGESTÓRIAS DO
LINGUADO (*Paralichthys orbignyanus*)

FERNANDA BRAZ CANDIOTTO

FURG

Rio Grande, RS

Março de 2013

Universidade Federal do Rio Grande
Programa de Pós-Graduação em Aquicultura

CARACTERIZAÇÃO DE ENZIMAS DIGESTÓRIAS DO LINGUADO (*Paralichthys
orbignyanus*)

FERNANDA BRAZ CANDIOTTO

Dissertação apresentada como parte dos requisitos
para a obtenção do grau de mestre em Aquicultura
no programa de Pós-Graduação em Aquicultura da
Universidade Federal do Rio Grande.

Orientador: Prof. Dr. Marcelo Borges Tesser

Rio Grande -RS- Brasil

Março, 2013

1 **Dedicatória**

2

3

4

“Amar o perdido

5

deixa confundido

6

este coração.

7

Nada pode o olvido

8

contra o sem sentido

9

apelo do Não.

10

As coisas tangíveis

11

tornam-se insensíveis

12

à palma da mão

13

Mas as coisas findas

14

muito mais que lindas,

15

essas ficarão”

16

Carlos Drummond de Andrade

17

18

19

20 *Dedico este trabalho à minha mãezinha, que mesmo em outro plano, continua a me*

21 *inspirar.*

22

23

24

25

26 **Agradecimentos**

27

28

29 São tantos ...

30 Tantos que me ouviram, aconselharam, ensinaram, orientaram, receberam e me
31 compreenderam. Estes sabem o quão sou agradecida!

32 Mas para registro acadêmico, fica aqui meu sincero agradecimento: ao meu
33 orientador Marcelo Tesser, aos alunos da EMA, do Labenz em Recife, aos tantos amigos
34 que encontrei nesta caminhada, que de forma direta e indireta à este trabalho me ajudaram
35 nestes dois anos de mestrado (Cassino, Recife, Santos, Florianópolis).

36 À minha família, meu grande bem precioso!

37 À fonte criadora da vida, deste universo! À todos ..

38 e tudo que este trabalho envolveu..

39 que me ensinaram a ser uma pessoa melhor.

40

41

42

43

44

45

46

47

48

49

50

51

Resumo

52 Na Europa e na Ásia são produzidas três espécies conhecidas como linguado (*Psetta*
53 *máxima*, *Paralichthys olivaceus* e *Cynoglossus semilaevis*). No Brasil não existe produção
54 comercial de linguado, no entanto a principal espécie alvo dos estudos é o *Paralichthys*
55 *orbignyianus*. Esta espécie já foi um recurso pesqueiro importante no sul do país, no
56 entanto, a pesca encontra-se estagnada. Assim, a produção deste linguado pode ser uma
57 alternativa para aumentar a oferta de pescado na região, devido às características que
58 apontam a viabilidade de criação como tolerância às concentrações elevadas de compostos
59 nitrogenados, variações de temperatura, bom crescimento em água salgada e salobra,
60 reprodução e larvicultura em cativeiro dominadas. Entretanto, ainda existe uma grande
61 carência de pesquisas relacionadas à fisiologia digestória da espécie. Para isso foi
62 determinada e caracterizada a atividade de enzimas digestórias presentes no fígado,
63 intestino e estômago do linguado (*Paralichthys orbignyianus*), através de substratos
64 inespecíficos e específicos, além de inibidores específicos. Os parâmetros físico-químicos
65 também foram determinados utilizando substratos específicos. Para a análise das enzimas
66 digestórias presentes no extrato bruto do intestino e fígado realizaram-se ensaios *in vitro* na
67 presença dos substratos de cadeia longa (azocaseína 1% e amido 2%), p-nitroanilide
68 (BAPNA, SApNA e Leu-p-Nan). Para análise de enzimas digestórias presente no extrato
69 bruto do estômago foi utilizado substrato hemoglobina. Para análise enzimática das
70 aminopeptidases presentes no extrato bruto do intestino foi usado o substrato β -
71 naphthylamide (alanina, arginina, leucina, prolina, tirosina, serina, glicina, isoleucina e
72 histidina). Atividade enzimática presente no extrato bruto do intestino foi: Azocaseína
73 ($0,3645 \pm 0,25 \text{mU mg}^{-1}$), BAPNA ($0,5119 \pm 0,2 \text{ mU mg}^{-1}$), SApNA ($2,6281 \pm 1,8 \text{ mU mg}^{-1}$),
74 Leu-p-Nan ($0,9709 \pm 0,83 \text{ mU mg}^{-1}$), amido (sem atividade). A atividade enzimática
75 presente no extrato bruto do fígado: Azocaseína ($0,27 \pm 0,01 \text{mU mg}^{-1}$), BAPNA (0),

76 SApNA($0,7 \pm 0,08 \text{ mU mg}^{-1}$), Leu-p-Nan (0), amido ($33,25 \pm 0,8 \text{ mU mg}^{-1}$).O efeito dos
77 inibidores específicos sobre a atividade residual das peptidases presentes no extrato bruto
78 do intestino apresentou o seguinte perfil: PMSF (BapNA= $52 \pm 2,3$; SapNa= $42 \pm 1,2$; Leu-p-
79 Nan= $43 \pm 1,4\%$), TLCK (BapNA= $33 \pm 1,8$; SapNa= $45 \pm 0,3$; Leu-p-Nan= $44 \pm 4,1\%$), TPCK
80 (BapNA= $100 \pm 1,2$; SapNa= $79 \pm 4,5$; Leu-p-Nan= $60 \pm 1,8\%$), Benzamidina (BapNA= $41 \pm 2,3$;
81 SapNa= $58 \pm 0,5$; Leu-p-Nan= $40 \pm 1,2\%$). Padrões de inibição peculiar podem ser explicados
82 devido à utilização do extrato bruto que apresenta outras enzimas, além destes inibidores
83 serem baseados em enzimas de mamíferos. O pH ótimo observado para a atividade de
84 tripsina, quimotripsina, leucino aminopeptidase, amilase e pepsina foi pH 9,5, 9, 8, 7,5 e
85 3,5, respectivamente. A temperatura ótima observada para a atividade destas enzimas foi
86 50, 50, 50, 40 e 45°C , respectivamente. A Alanina e a Leucina aminopeptidases
87 apresentaram uma alta atividade comparada à outras aminopeptidases avaliadas. A tripsina
88 e leucino aminopeptidase demonstraram ser termoestáveis até 70 e 50°C , respectivamente.
89 Características que indicam a possibilidade de aplicação biotecnológica.

90
91
92
93
94
95
96
97
98
99
100

101

Abstract

102 In Europe and Asia three species known as flounder (*Psetta maximum* *Paralichthys*
103 *olivaceus* and *Cynoglossus semilaevis*) are reared. In Brazil the flounder production is still
104 incipient and is the main species found *Paralichthys orbignyanus*. This species was an
105 important fishery resource in the South Brazil. However, fishing is stagnant. Thus, the
106 production of this flounder in captivity can be an alternative to increase the supply of fish
107 in the region, due to the characteristics that indicate the feasibility of creating such
108 tolerance to high concentrations of nitrogen compounds, temperature variations, good
109 growth in saltwater and brackish, and knowledge about reproduction and larviculture.
110 However, there is still a lack of information related to the digestive physiology of the
111 species. This dissertation investigated and characterized the digestive enzymes activities
112 presented in liver; intestine and stomach of juvenile flounder (*Paralichthys orbignyanus*)
113 through nonspecific and specific substrates, in addition to specific inhibitors. The physico-
114 chemical parameters were determined using specific substrates. For the analysis of
115 enzymes digestive present in the crude extract of the liver and intestine were performed in
116 vitro in the presence of long chain substrates (1% azocasein 2% and starch), p-nitroanilide
117 (BApNA, Sapna and Leu-p-Nan). For analysis of enzymes present in the crude extract
118 digestive stomach hemoglobin substrate was used. For enzymatic analysis of the
119 aminopeptidase present in the crude extract was used intestine β -naphthylamide substrate
120 (alanine, arginine, leucine, proline, tyrosine, serine, glycine, isoleucine and histidine).
121 Enzyme activity present in the crude extract of the intestine was: azocasein (0.3645 ± 0.25
122 mU mg^{-1}), BApNA ($0.5119 \pm 0.2 \text{ mU mg}^{-1}$), Sapna ($2.6281 \pm 1.8 \text{ mU mg}^{-1}$), Leu-p-Nan
123 ($0.9709 \pm 0.83 \text{ mU mg}^{-1}$), starch (0). Enzyme activity present in the crude extract of the
124 liver: azocasein ($0.27 \pm 0.01 \text{ mU mg}^{-1}$), BApNA (0), Sapna ($0.7 \pm 0.08 \text{ mU mg}^{-1}$), Leu-p-
125 Nan (0), starch ($33.25 \pm 0.8 \text{ mU mg}^{-1}$). The effect of specific inhibitors on the residual

126 activity of peptidases present in the crude extract of the intestine showed the following
127 profile: PMSF (BAPNA = 52 ± 2.3 ; Sapna = 42 ± 1.2 ; -Leu-Nan p = 43 ± 1 , 4%), TLCK
128 (BAPNA = 33 ± 1.8 ; Sapna = 45 ± 0.3 , p-Leu-Nan = $44 \pm 4.1\%$), TPCK (BAPNA = $100 \pm$
129 1.2 ; Sapna = 79 ± 4.5 , Leu-p-Nan = $60 \pm 1.8\%$), Benzamidine (BAPNA = 41 ± 2.3 ; Sapna
130 = 58 ± 0.5 , p-Leu-Nan = $40 \pm 1.2\%$). The peculiar inhibition patterns can be explained by
131 the use of crude extracts, which presents other enzymes, and these inhibitors are based on
132 mammalian enzymes. The optimum pH observed for the activities of trypsin,
133 chymotrypsin, leucino aminopeptidase, amylase and pepsin were pH 9.5, 9, 8, 7.5 and 3.5,
134 respectively. The optimum temperatures for the observed activities of these enzymes were
135 50, 50, 50, 40 and 45 ° C respectively. Alanine and leucine aminopeptidase showed high
136 activity compared to other aminopeptidases evaluated. Trypsin and leucine
137 aminopeptidases showed to be thermostable up to 70 ° C and 50 respectively.
138 Characteristics that indicate the possibility of biotechnological applications.
139

| | |
|-----|--|
| 140 | Lista de abreviaturas |
| 141 | AA-NA - aminoacyl β -naftilamida |
| 142 | BAPNA - benzoil arginina ρ -nitroanilida |
| 143 | DMSO - dimetil sulfóxido |
| 144 | DNSA ácido 3,5 – dinitrossalicílico |
| 145 | EC – Enzyme Commission |
| 146 | EDTA - ácido etilenodiaminotetracético |
| 147 | IUBMB – União Internacional de Bioquímica e Biologia Molecular |
| 148 | Leu-p-Nan – leucina- ρ -nitroanilida |
| 149 | pH - potencial hidrogeniônico |
| 150 | PMSF – Fluoreto fenil metil sulfonil |
| 151 | SAPNA - N-succinil-Ala-Ala-Pro-Phe- ρ -nitroanilida |
| 152 | TCA - Ácido Tricloroacético |
| 153 | TLCK – tosil cetona lisina clorometil |
| 154 | TPCK – tosil fenilalanina clorometil cetona |
| 155 | |
| 156 | |
| 157 | |
| 158 | |
| 159 | |

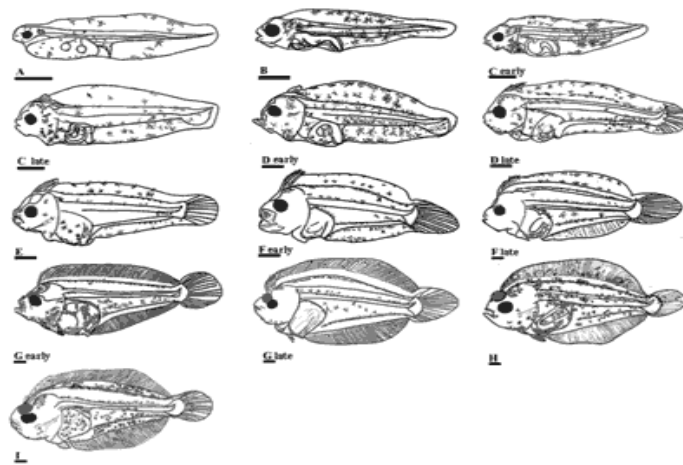
| | | |
|-----|---|----|
| 160 | Sumário | |
| 161 | 1. Introdução Geral | 10 |
| 162 | 1.1. Linguado (<i>Paralichthys orbignyanus</i>)..... | 10 |
| 163 | 1.2. Importância econômica..... | 12 |
| 164 | 1.3. Estudos conduzidos com <i>Paralichthys orbignyanus</i> | 12 |
| 165 | 1.4. Sistema digestório dos peixes..... | 13 |
| 166 | 1.5. Enzimas..... | 16 |
| 167 | 1.6. Enzimas digestórias..... | 18 |
| 168 | 1.7. Enzimas digestórias em peixes..... | 20 |
| 169 | 1.8. Aplicações Biotecnológicas..... | 23 |
| 170 | 2. Objetivos | 24 |
| 171 | 2.1. Objetivo geral..... | 24 |
| 172 | 2.2. Objetivos específicos..... | 24 |
| 173 | Referências Bibliográficas | 25 |
| 174 | Artigo anexo – Caracterização de enzimas digestórias do linguado <i>Paralichthys</i> | |
| 175 | <i>orbignyanus</i> | 37 |
| 176 | Resumo | 38 |
| 177 | Abstract | 40 |
| 178 | 1. Introdução | 42 |
| 179 | 2. Material e Métodos | 43 |
| 180 | 2.1. Material Biológico..... | 43 |
| 181 | 2.2. Extração enzimática e determinação de proteína total solúvel..... | 44 |
| 182 | 2.3. Ensaio enzimáticos não-específicos..... | 44 |
| 183 | 2.4. Ensaio enzimático específico..... | 45 |
| 184 | 2.5. Atividade das aminopeptidases..... | 46 |

| | | |
|-----|---|-----------|
| 185 | 2.6. Atividade amilolítica..... | 46 |
| 186 | 2.7. Propriedades físico químicas..... | 46 |
| 187 | 2.8. Ensaio de inibição..... | 47 |
| 188 | 2.9. Estatística..... | 47 |
| 189 | 3. Resultados..... | 48 |
| 190 | 4. Discussão..... | 54 |
| 191 | 4.1. Atividade enzimática..... | 54 |
| 192 | 4.2. Efeito do pH nas peptidases e na amilase..... | 56 |
| 193 | 4.3. Efeito da temperatura nas peptidases e amilase..... | 57 |
| 194 | 4.4. Efeito dos inibidores nas peptidases alcalinas e na amilase..... | 60 |
| 195 | 4.5. Aplicações biotecnológicas..... | 61 |
| 196 | Referências Bibliográficas..... | 63 |
| 197 | | |
| 198 | | |
| 199 | | |
| 200 | | |
| 201 | | |
| 202 | | |
| 203 | | |
| 204 | | |
| 205 | | |
| 206 | | |
| 207 | | |
| 208 | | |
| 209 | | |

210 **1. Introdução geral**

211 **1.1. Linguado (*Paralichthys orbignyanus*)**

212 Atualmente são conhecidas 25 espécies do gênero *Paralichthys* em todos os
213 oceanos (ITIS, 2013). Apresentam formato plano e assimétrico, devido à metamorfose
214 marcante que ocorre durante o estágio larval. Nesta fase a transição da simetria bilateral
215 em um formato assimétrico e comprimido dorso-ventral, onde um dos olhos migra para o
216 lado oposto da cabeça (Ahlstrom et al., 1984). Além da mudança morfológica, os peixes
217 após a metamorfose alteram seu comportamento pelágico para o demersal (Nelson, 2006).



218

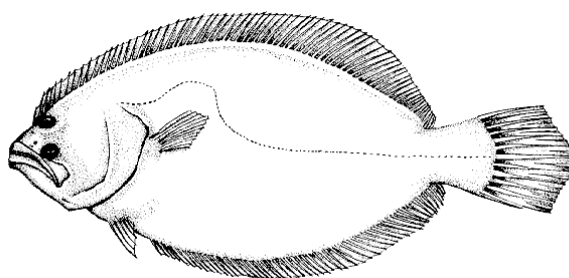
219 **Figura 1.** Metamorfose que ocorre durante o estágio larval de espécies do gênero
220 *Paralichthys* (Martinez & Bolker 2003)

221 No sul do Brasil há a ocorrência de três espécies do gênero *Paralichthys*: *P.*
222 *orbignyanus* (Valenciennes (1839), *P. patagonicus* e *P. isosceles* (Bianchini et al., 2010).
223 O linguado *Paralichthys orbignyanus* habita áreas estuarinas e costeiras desde o Rio de
224 Janeiro no Brasil até Mar del Plata, na Argentina, habitando águas inferiores a 20 m,
225 enquanto as demais espécies são encontradas em águas de maior profundidade (Figueiredo
226 e Menezes, 2000).

227 *P. orbignyanus* possui alto valor comercial, por ser considerada a espécie de
228 linguado de maior porte no Sul do Brasil, podendo atingir peso superior a 10 kg, indicando
229 potencial para aquicultura (Bianchini et al., 2010).

230 Apresenta pigmentação apenas do lado direito do corpo, apresentando manchas
231 negras arredondadas de tamanhos variados (Figueiredo e Menezes, 2000). Geralmente
232 encontram-se camuflados no ambiente, enterrando-se na areia. Possui boca grande, dentes
233 bem desenvolvidos adaptados para a predação e hábito alimentar carnívoro. No estuário
234 não demonstram seletividade, sendo oportunistas quanto à alimentação. Os juvenis
235 alimentam-se basicamente de poliquetas e crustáceos, e os adultos passam a alimentar-se
236 basicamente de peixes, camarões e caranguejos (Cazorla e Forte, 2005).

237 O período de reprodução desta espécie no sul do Brasil tem início em outubro e
238 segue até abril (Silveira et al., 1995), sendo influenciados pelo aumento do fotoperíodo e
239 da temperatura (Sampaio et al., 2008). Realiza desova anual múltipla, em ambiente
240 marinho e suas larvas migram para o estuário para se desenvolverem (Bianchini et al.,
241 2010).



242

243 **Figura 2.** Desenho de um exemplar adulto de *Paralichthys orbignyanus* (Cousseau e
244 Perrota, 1998).

245

246 **1.2. Importância econômica**

247 Em várias regiões do mundo, especialmente na Europa e na Ásia, os linguados são
248 criados, como o turbot (*Psetta maxima*), o hirame (*Paralichthys olivaceus*) e o
249 (*Cynoglossus semilaevis*). A produção destas espécies aumentou significativamente de
250 26.300 t em 2000 para 148.000 t em 2008 (FAO, 2010).

251 No continente americano, a produção de linguado obtida da aquicultura ainda não é
252 significativa (FAO, 2010). Porém, várias espécies do gênero *Paralichthys* estão em estudo,
253 dentre elas o *P. patagonicus* e *P. orbygnianus* na Argentina (Bambill et al. 2006), *P.*
254 *microps* e *P. adspersus* no Chile (Alvial e Manriquez, 1999), *P. woolmani* no Equador
255 (Guartatanga, 1997), *P. lethostigma* e *P. dentatus* nos Estados Unidos (Lee e Ostrowski,
256 2001) e *P. tropicus* na Venezuela (Rosas et al. 1999).

257 No Brasil a espécie em estudo para a criação é o *Paralichthys orbignyanus*. Esta
258 espécie já foi um recurso pesqueiro importante para a região sul do país. No entanto, a
259 pesca do linguado no estuário da Lagoa dos Patos (RS) e na costa marinha adjacente está
260 estagnada desde 2003 (MPA, 2010). Ainda segundo o Boletim Estatístico de Pesca e
261 Aquicultura a captura do linguado no Brasil em 2008 foi de 3,4t e em 2009 3,1t e 2010 3,2t
262 (MPA, 2010).

263 **1.3. Estudos conduzidos com *Paralichthys orbignyanus***

264 A produção de linguado em cativeiro pode ser uma alternativa para aumentar a
265 oferta de pescado (Sampaio et al. 2008). Alguns trabalhos apontam a viabilidade da criação
266 desta espécie, que apresenta características como tolerância à concentrações elevadas à
267 compostos nitrogenados (Bianchini et al. 1996), variações de temperatura (Wasielesky et
268 al. 1998), bom crescimento em água salgada ou salobra (Sampaio et al. 2001),
269 sobrevivência por longos períodos em água doce (Sampaio e Bianchini 2002), reprodução

270 em cativeiro e larvicultura dominadas (Sampaio et al. 2008), temperatura ideal na fase de
271 berçário (Okamoto e Sampaio, 2012).

272 Diversos estudos com esta espécie são encontrados na literatura como:
273 desenvolvimento dos ovos, estudo primordial para a reprodução artificial em ambientes
274 controlados (Cerqueira, 2005). Meier et al. (2009) relacionou o estresse hiperosmótico com
275 o aumento do hormônio de crescimento, sendo este parâmetro útil para conseguir um
276 melhor desempenho para a espécie. Campos et al. (2010) concluiu que o neuropeptídeo Y é
277 influenciado pela temperatura, tal hormônio seria um grande estimulante de ingestão de
278 alimentos.

279 Radonic e Macchi (2009) investigaram a diferenciação sexual por meio de cortes
280 histológicos. Trabalhos semelhantes são escassos, porém importantes, devido às fêmeas
281 tanto selvagens como criadas em cativeiro apresentarem maior taxa de crescimento que os
282 machos (Cazorla, 2005).

283 Robaldo et al. (2012) relataram maior rendimento de filé para peixes criados em
284 cativeiro, do que para selvagens, além da grande quantidade de pele que pode ser usada
285 como matéria prima para a indústria de couro, ou extração de colágeno (Singh et al., 2011),
286 contribuindo assim, para a viabilidade econômica da espécie.

287 Trabalhos descrevendo a presença de parasitos e enfermidades em linguados
288 também são encontrados, como Caligadae *Caligus sp.* (Robaldo et al., 2002), Lernaiedae
289 *Brasilochondria riograndensis* (Thatcher e Pereira Jr., 2004), *Amyloodinium ocellatum*
290 (Abreu, 2005), Ergasilidae *Therodamas fluviatilis* (Velloso et al., 2005), mixosporídeo
291 *Myxobolus sp.* (Eiras et al., 2007) *Bacciger* (Alarcos et al., 2008), apicomplexa
292 *Haemogregarina platessae* (Davies et al., 2008). Além da presença de micobacteriose
293 (Romano et al., 2012).

294 **1.4. Sistema digestório de peixes**

295 Os peixes em geral apresentam variações de estrutura do trato digestório de espécie
296 para espécie, a qual está correlacionada ao tipo de dieta e ao ambiente, e podem influenciar
297 a presença, posição, formato e tamanho de um órgão em particular (Rotta, 2003). O trato
298 digestório dos peixes compreende o tubo que vai da boca ao ânus, por onde passam os
299 alimentos. Pode ser subdividido em cavidade bucal ou bucofaringeana, intestino anterior
300 (esôfago e estômago), intestino médio (intestino propriamente dito) e intestino posterior
301 (reto). Órgãos anexos ao sistema digestório são o pâncreas, vesícula biliar (quando
302 presente) e fígado (Rust, 2002). Os vários tecidos e órgãos relacionados a ele estão
303 envolvidos com a apreensão, mastigação e deglutição, seguidas da digestão e absorção dos
304 nutrientes, como também com a excreção (Rotta, 2003).

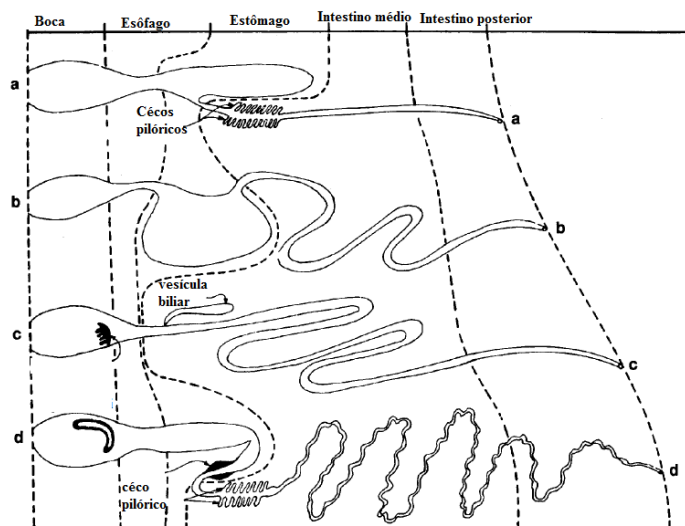
305 Conforme o hábito alimentar dos peixes, são divididos basicamente em carnívoros
306 (alimentam-se de peixes e invertebrados maiores), onívoros (alimentam-se de dieta mista),
307 herbívoros (alimentam-se de plantas) e detritívoros (que ingerem detritos) (Rust, 2002).

308 Peixes carnívoros geralmente apresentam boca grande, permitindo ingerir grandes
309 presas, enquanto peixes herbívoros apresentam boca pequena e tubular, permitindo a
310 sucção dos alimentos. O esôfago é quase sempre um tubo curto, largo, reto e muito
311 musculoso. Sua função é de transporte de alimentos ao estômago. Pode desempenhar
312 diferentes funções como a de osmorregulação em peixes eurialinos, ou auxiliar na
313 respiração. Este órgão é de difícil identificação em teleósteos. O estômago de peixes
314 carnívoros apresentam glândulas gástricas mais desenvolvidas e de maior volume devido
315 às presas que consomem. Peixes de hábitos onívoro e herbívoro realizam diversas refeições
316 por dia, porém consomem pouco alimento, assim apresentam geralmente estômago de
317 menor volume (Rotta, 2003).

318 Os cecos pilóricos são estruturas especializadas encontradas no intestino, com
319 características histológicas e histoquímicas semelhantes, sugerindo que estas estruturas

320 sirvam para aumentar a superfície intestinal sem aumentar o comprimento ou espessura do
321 intestino. São mais desenvolvidos em peixes carnívoros e reduzidos, ou mesmo ausentes,
322 nos herbívoros. Entretanto, não está bem definido se há relação entre a presença de cecos
323 pilóricos e a dieta do peixe, pois eles ocorrem nos peixes carnívoros, onívoros e
324 herbívoros.

325 O intestino é o órgão onde ocorre a maior parte da absorção dos nutrientes, íons e
326 água oriundos da dieta. Nos peixes, além da função de digestão e absorção, o intestino
327 pode desempenhar outras funções, como auxiliar na osmorregulação ou na respiração
328 (Rotta, 2003). O comprimento do intestino varia conforme o hábito alimentar e as
329 características dos alimentos naturalmente ingeridos pelos peixes. Os carnívoros possuem,
330 basicamente, um intestino curto, reto e espesso, os onívoros um intestino em forma de “N”
331 e os herbívoros possuem um intestino longo, enovelado e fino. Peixes herbívoros e
332 fitoplanctófagos consomem alimentos de menor digestibilidade e apresentam, geralmente,
333 intestinos mais longos se comparados aos peixes carnívoros (Rust 2002; Rotta, 2003).



334

335 **Figura 3.** Diagrama modificado de Smith (1989) do sistema digestório de peixes
336 (a) carnívoro, (b) onívoro, com maior alimentação de origem animal, (c) onívoro com
337 maior alimentação de origem vegetal, (d) herbívoros.

338 **1.5. Importância biológica das enzimas**

339 Enzimas são proteínas que atuam na diminuição do nível de energia de ativação,
340 implicando no aumento da velocidade das reações bioquímicas (Champe et al., 2009).
341 Estão presente em todos os organismos vivos, sendo essenciais para a manutenção,
342 crescimento e diferenciação celular (Gupta et al., 2002). Agem em sequências organizadas
343 e catalisam centenas de reações sucessivas, pelas quais as moléculas de nutrientes são
344 degradadas. Essas biomoléculas catalisadoras não reagem quimicamente com as
345 substâncias sobre as quais atuam, nem alteram o equilíbrio das reações. Provavelmente,
346 apenas uma fração da molécula denominada sítio ativo é a responsável pela ligação da
347 enzima ao substrato e essa fração determina a especificidade enzimática (Nelson e Cox,
348 2004).

349 A reação química catalisada por uma enzima é propriedade específica que distingue
350 uma enzima de outra, desta forma, a IUBMB (União Internacional de Bioquímica e
351 Biologia Molecular) dividiu as enzimas em seis grandes classes (Tabela 1).

352 **Tabela 1.** Classificação das enzimas segundo a IUBMB.

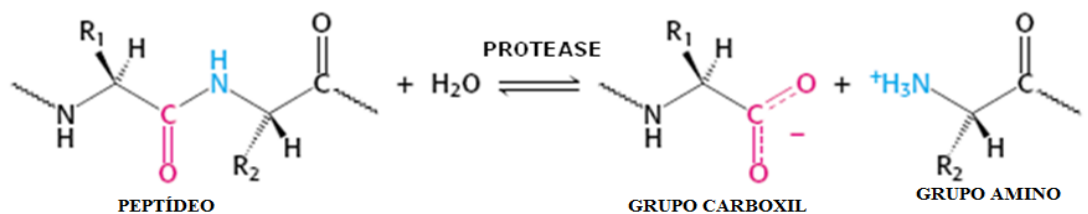
| CLASSE | REAÇÕES QUE CATALISAM |
|--------------------|--|
| 1. Oxidorredutases | Reações de oxidação-redução |
| 2. Transferases | Reações de grupos contendo C, N ou P - |
| 3. Hidrolases | Clivagem das reações adicionando água |
| 4. Liasas | Clivagem de C-C, C-S e certas ligações de C-N |
| 5. Isomerases | Racemização de isômeros ópticos ou geométricos |
| 6. Ligases | Formação de pontes entre C e O, S, N acoplados a hidrólise de fosfatos de alta energia. |

353 C, carbono; N, nitrogênio; P-, íon fosfato; S, enxofre; O, oxigênio.

354 Fonte: (Nelson e Cox, 2004).

355 De acordo com a IUBMB as peptidases estão no grupo três (Hidrolases), pois por
356 uma reação de hidrólise, clivam ligações peptídicas adicionando uma molécula de água
357 (Berg et al., 2004) (Figura 4).

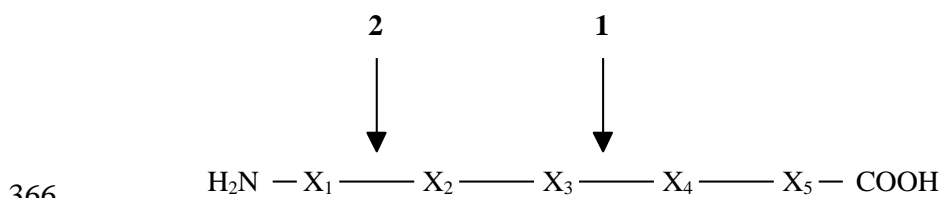
358



359

360 **Figura 4.** Hidrólise enzimática de uma proteína hipotética. (Fonte: Berg et al.,
361 2004).

362 A tripsina e a quimotripsina são endopeptidases, ou seja, clivam as ligações
363 peptídicas dentro da proteína, enquanto as aminopeptidases são exopeptidases (Figura 5),
364 isto é, clivam resíduos de aminoácidos na posição N-terminal da proteína (Gonzalez e
365 Robert-Baudouy, 1996).



366 **Figura 51.** Classificação das peptidases: Endopeptidases clivam ligações peptídicas
367 dentro da proteína (1). Exopeptidases, mais especificamente as aminopeptidases, clivam
368 resíduos localizados na posição N-terminal da proteína (2). Figura modificada de Gonzalez
369 e Robert-Baudouy (1996).

371 As enzimas amilolíticas são classificadas segundo a IUBMB de acordo com o tipo
372 de ligação em que atuam: hidrolisadoras de ligações α -1,4-glicosídicas (α -amylase, EC
373 3.2.1.1), hidrolisadoras de ligações α 1,6-glicosídicas (pululanase, EC 3.2.1.41 ou
374 isoamilase 3.2.1.68), transglicosilação para formação de ligações α -1,4 (ciclodextrina
375 glicosiltransferase – GCTase, EC 2.4.1.19) ou transglicosilação para formação de ligações
376 α -1,6 (enzima ramificadora, EC 2.4.1.18) (Kuriki e Imanaka, 1999).

377 **1.6. Enzimas digestórias**

378 Dentre as peptidases digestórias de maior importância encontram-se a tripsina, a
379 quimotripsina e as aminopeptidases. As peptidases digestórias do pâncreas são produzidas
380 sob a forma de zimogênios, como o tripsinogênio, que é ativada no lúmen do intestino pela
381 ação da enteroquinase, uma peptidase do intestino delgado, que hidrolisa uma ligação
382 peptídica específica no tripsinogênio, transformando-o em tripsina ativa. A partir disto, as
383 moléculas de enteroquinase juntamente com as de tripsina (recém - ativadas) promovem
384 um efeito cascata, responsável pela ativação de novos tripsinogênios e outros zimogênios
385 como quimotripsinogênio, procarboxipeptidase, proelastase e profosforilase (Brody, 1994).

386 Segundo Rotta (2003), na maioria dos teleósteos, o pâncreas encontra-se difuso em
387 outros órgãos, como no fígado, intestino e cécos pilóricos. Einarsson e Davies (1996)
388 relataram que o tripsinogênio e quimotrispinogênio estão contidos nos grânulos secretores
389 das células acinares pancreáticas, tanto dos peixes como nos vertebrados superiores, sendo
390 estimulados pelo hormônio colecistoquinina.

391 Diversos estudos tem demonstrado que a tripsina pode ser um indicador nutricional,
392 por ser considerada uma enzima chave no processo de digestão (Cara et al. 2007), pois
393 ativa sua própria forma precursora (tripsinogênio), assim como várias outras peptidases,
394 incluindo a quimotripsina (Sunde et al., 2004). A atividade específica da tripsina e a taxa
395 de atividade tripsina/quimotripsina (T/Q) são afetadas geneticamente e ambientalmente e

396 são considerados parâmetros biológicos chave que afetam o processo digestivo e
397 conseqüentemente a taxa de crescimento (Rungruangsak-Torrissen et al., 2009).

398 A tripsina (EC 3.4.21.4) faz parte da família das serino peptidases, caracterizadas
399 por apresentar um mecanismo comum, envolvendo a presença de uma tríade catalítica
400 composta de resíduos específicos: serina, histidina e ácido aspártico. Esta enzima cliva as
401 ligações peptídicas no lado carboxila de resíduos de aminoácidos carregados positivamente
402 como arginina e lisina (Klomklao et al., 2007). Sánchez-Paz et al. (2003) estimam que esta
403 enzima contribui em torno de 60% na digestão protéica. A atuação da tripsina é importante
404 em vários processos biológicos como: digestão protéica propriamente dita, ativação de
405 zimogênios e mediação entre a ingestão do alimento e assimilação dos nutrientes (Sainz et
406 al., 2004). Devido à extrema relevância funcional da tripsina, associada a uma ampla
407 aplicabilidade industrial, esta enzima é uma das mais estudadas em organismos aquáticos
408 (Freitas-Junior et al., 2012).

409 A tripsina caracteriza-se por apresentar o maior nível de atividade nos valores de
410 pH entre 8.0 e 11.0 e em temperaturas de 35 a 45 °C. Esta enzima pode ter sua atividade
411 alterada em pH abaixo de 5.0 e acima de 11.0 ou pela presença de alguns inibidores como
412 diisopropil-fluorfosfato (DFP), fluoreto fenil-metil-sulfonil (PMSF), inibidor de tripsina de
413 soja (SBTI) e aprotinina. Dentre os substratos sintéticos hidrolizados pela tripsina e usados
414 em pesquisas científicas destacam-se: N- α -benzoil-L-arginina-p-nitoanilida (BApNA) e
415 tosil-arginina-metil-éster (TAME) (Whitaker, 1994; Simpson, 2000).

416 A quimotripsina (EC 3.4.21.4) é outro membro da família das serino peptidases,
417 com função digestória. Em geral estas enzimas são moléculas polipeptídicas com pesos
418 moleculares de 25 a 28 kDa, sendo mais ativas dentro do pH 7.5 a 8.5 e mais estáveis em
419 pH 9.0 (Simpson, 2000). Esta endopeptidase possui uma especificidade maior que a
420 tripsina, clivando ligações peptídicas na porção carboxila de aminoácidos aromáticos, tais

421 como tirosina, fenilalanina, triptofano (Simpson, 2000) e também substratos sintéticos, tais
422 como SApNA (De Vecchi e Coppes, 1996; Castillo-Yañez et al., 2006).

423 Após a hidrólise de proteínas por proteinases, estas são degradadas em frações
424 menores a aminoácidos livres, melhorando a absorção destes nutrientes (Buarque et al.
425 2009). As principais enzimas responsáveis pela liberação dos aminoácidos livres são as
426 aminopeptidases. Além dos aminoácidos, as aminopeptidases liberam também pequenos
427 peptídeos através da hidrólise das ligações peptídicas na posição N-terminal de proteínas
428 (Gonzalez e Robert-Baudouy, 1996).

429 **1.7. Enzimas digestórias em peixes**

430 As peptidases encontradas nos órgãos digestórios da maioria dos peixes são pepsina,
431 gastrina, tripsina, quimotripsina, carboxipeptidase, colagenase, elastase e esterase carboxila
432 (Haard, 1994; Simpson, 2000). Segundo Rust (2002) *Cyprinus carpio* não possui
433 estômago, portanto não apresentam a pepsina. Em animais aquáticos, especialmente nos
434 teleósteos, as peptidases mais citadas e estudadas são a tripsina, quimotripsina e elastase
435 (De Vecchi e Coppes, 1996).

436 A pepsina é uma protease ácida localizada no estômago (Gildberg e Overbo, 1990),
437 enquanto que a tripsina é uma protease alcalina, encontrada em sua forma ativa nos cecos
438 pilóricos e/ou intestino (Kishimura et al., 2006). A secreção destas enzimas é realizada por
439 meio de estímulos neurais e hormonais, os quais provocam aumento na secreção
440 enzimática para a luz do trato digestório (Fange e Chiou, 1989).

441 O primeiro registro de estudo sobre peptidases digestórias de peixes data da década
442 de 40, quando uma pepsina de salmão foi cristalizada (Norris e Elam, 1940). Desde então,
443 peptidases digestórias de peixes vêm sendo comumente estudadas incluindo as pepsinas:
444 *Merluccius gayi* (Sanchez-Chiang e Ponce, 1982), *Salmo gairdneri* (Twining et al., 1983),
445 *Gadus mohua* (Gildberg e Overbo, 1990; Martinez e Olsen, 1989), *Oncorhynchus keta*

446 (Sanchez-Chiang et al., 1987), *Sebastes mentella*, *Sparus aurata*, *Scophthalmus maximus*
447 (Munilla-Morán e Saborido-rey, 1996), *Takifugu rubripes* (Kurokawa et al., 2005) e
448 *Paralichthys olivaceus* (Deng et al., 2010), como as tripsinas: *Salmo gairdneri*
449 (Kitamikado e Tachino, 1960), *Gadus morhua* (Asgeirsson et al., 1989), *Oncorhynchus*
450 *mykiss* (Kristjánsson, 1991); *Oreochromis niloticus* (Bezerra et al., 2005); *Pseudupeneus*
451 *maculatus* (Souza et al., 2007) *Colossoma macropomum* (Marcuschi et al., 2010);
452 *Oreochromis niloticus* x *O.aureus* (Wang et al., 2010); *Paralichthys olivaceus* (Kim e
453 Jeong, 2012).

454 A pepsina (E.C. 3.4.23.1) é encontrada na sua forma inativa (pepsinogênio), que é
455 ativado pelo ácido clorídrico, secretado pelo estômago, ativando-a. Este zimogênio é
456 ativado por autocatálise, liberando cerca de 40 a 50 resíduos de aminoácidos da sua região
457 N-terminal (Brody, 1994). Esta enzima é composta por uma única cadeia polipeptídica de
458 321 aminoácidos com peso molecular de 35 kDa (Simpson, 2000). No entanto, pepsinas de
459 animais marinhos possuem pesos moleculares que variam de 27 a 42 kDa (Sanchez-Chiang
460 et al., 1987; Klomklao, 2008).

461 A quantidade de carboidrases é grande devido sua alta especificidade. O amido e
462 glicogênio são degradados por alfa-amilases em oligossacarídeos ou também em maltose.
463 A digestão dos carboidratos é realizada no intestino por uma variedade de enzimas. A mais
464 comum é a amilase, produzida pelo pâncreas, que atua em ligações glicosídicas α -1,4
465 encontradas no amido (Lovell, 1998). Esta enzima encontra-se em todo intestino dos
466 peixes (Kuz'mina, 1977). Apresentam uma ampla faixa de atuação (20-40°C) e atividade
467 máxima em pH de 6-8.

468 A atividade amilolítica tem sido observada em vários teleósteos herbívoros,
469 onívoros e carnívoros, em diferentes regiões do aparelho digestório, principalmente, nos
470 cecos pilóricos, no estômago, no fígado, no pâncreas e na região bucofaringeana (Hidalgo,

471 1999; Seixas Filho, 2003; Deng et al., 2010; Ren et al., 2011). A utilização deste nutriente
472 difere entre as espécies e depende da fonte do carboidrato ingerida (Yamamoto et al.,
473 2000).

474 Espécies de peixes, particularmente carnívoros, geralmente utilizam mal o
475 carboidrato da dieta como fonte de energia e normalmente exigem altos níveis de proteína
476 na dieta (Wilson, 1994). No entanto, alguns carnívoros mostraram maior crescimento
477 quando alimentados com uma dieta em que possuía certa quantidade de amido, em
478 comparação da dieta sem amido (Henre et al., 2002).

479 Vários estudos de caracterização e identificação de amilases são encontrados na
480 literatura, tanto para espécies carnívoras como omnívoras, como: *Rachycentron canadum*
481 (Rem et al., 2011); *Paralichthys olivaceus* (Deng et al., 2010); *Glyptosternum maculatum*
482 (Xiong et al., 2009); *Thunnus orientalis* (Parra et al., 2007); *Colossoma macropomum*
483 (Almeida et al., 2006); *Paralichthys californicus* (Alvarez-González et al., 2006);
484 *Acipenser naccarii* e *Oncorhynchus mykiss* (Furné et al., 2005). Deng et al. (2010)
485 identificou atividade da amilase no fígado, intestino e estômago.

486 A caracterização das enzimas digestórias é um processo importante para a
487 compreensão dos mecanismos digestivos e formulações de rações que promovam melhores
488 respostas de crescimento (Kolkovski 2001; López-López et al., 2005). De acordo com
489 Lundstedt et al. (2004) a atividade enzimática digestória é um indicador confiável do
490 estado nutricional dos peixes.

491 Na aquicultura a alimentação representa um dos maiores custos de produção, em
492 muitos casos representando 50% do total das despesas (Alam e Watanabe, 2009). Rações
493 comerciais para peixes possuem preços relativamente altos, devido à alta taxa de inclusão
494 de diversos nutrientes, principalmente a proteína.

495 O conhecimento a respeito das propriedades enzimáticas, fisiologia e nutrição ainda
496 são escassos para a espécie *Paralichthys orbignyanus*. Diante deste fato, torna-se evidente
497 que a caracterização de enzimas digestórias para o linguado representa um estudo básico,
498 que subsidiará o conhecimento de enzimas-chave no processo de absorção de proteína e
499 carboidratos da dieta, servindo de referência para futuros estudos de digestibilidade e
500 nutrição, que contribuirão para o desenvolvimento de rações mais apropriadas no mercado.

501 **1.8. Aplicações biotecnológicas**

502 Um aumento marcante no uso de peptidases alcalinas como catalisadores industriais
503 são registrados nos últimos anos, por oferecerem vantagens em comparação aos
504 catalisadores químicos convencionais: possui alta atividade catalítica, alto grau de
505 especificidade pelo substrato, podem ser produzidas em larga escala, são economicamente
506 viáveis e biodegradáveis (Gupta et al., 2002).

507 As peptidases vêm sendo amplamente utilizadas nas indústrias de detergentes,
508 alimentos, farmacêutica, couro e em processos de bioremediação (Rao et al., 1998) devido
509 as recentes tentativas de desenvolvimento de tecnologias ambientalmente corretas.
510 Atualmente, as peptidases são as principais enzimas industriais, grande parte, obtidas a
511 partir de microorganismos (Johnvesly, 2001).

512 As vísceras dos peixes correspondem a aproximadamente 5% do seu peso total,
513 sendo fonte de enzimas digestórias (Cancre et al., 1999). Segundo Asgeirsson et al. (1989),
514 o intestino dos peixes contém cerca de 1 g de enzimas proteolíticas alcalinas (tripsina,
515 quimotripsina e elastase) por quilo, possuindo alto potencial biotecnológico.

516 Além da aplicabilidade na aquicultura, o estudo de enzimas digestórias aliadas a
517 grande quantidade de vísceras de peixes disponíveis no mercado (De Vecchi e Coppes,
518 1996) tornam estas enzimas com potencial para uso em indústrias de alimentos e
519 detergentes, visto que peixes como animais ectotérmicos, apresentam adaptações em suas

520 enzimas, como maior resistência a variações de temperatura do que os animais
521 homeotérmicos (Bezerra et al., 2001).

522 **2. Objetivos**

523 **2.1. Objetivo geral**

524 Caracterizar as peptidases e amilases do linguado (*Paralichthys orbignyanus*).

525 **2.1. Objetivos específicos**

- 526 · Investigar a presença de endo/exopeptidases e amilases
527 utilizando diferentes substratos;
- 528 · Definir as propriedades físico-químicas das peptidases
529 alcalinas, ácidas e de enzimas amilolíticas utilizando substratos específicos
530 e inespecíficos;
- 531 · Avaliar efeito de inibidores específicos sobre as enzimas:
532 tripsina, quimotripsina, leucino-aminopeptidase e amilase;
- 533 · Comparar as propriedades das enzimas estudadas com
534 aquelas descritas na literatura;

535

536

537 **3. Referências Bibliográficas**

538 Abreu, P. C.; Robaldo, R. B.; Sampaio, L. A.; Bianchini, A.; Odebrecht, C., 2005:
539 Recurrent amyloidinosis on broodstock of the brazilian flounder *Paralichthys*
540 *orbignyanus*: Dinospore monitoring and prophylactic measures. J. World Aquacult. Soc.
541 **36**, 45-50.

542 Ahlstrom, E. H.; Amaoka, K.; Hensley, D. A.; Moser, H. G.; Sumida, B. Y.; 1984:
543 Pleuronectiformes: Development. In: *Ontogeny and Systematics of Fishes*. Am. Soc.
544 Ichthyol. Herpec. Special Publication, **1**, 640-670.

545 Alam, M.S.; Watanabe, W.O., 2009: Effect of diferente dietary protein and lipid
546 levels on growth performance and body composition of juvenile southern flouder,
547 *Paralichthys lethostigma*, reared in a recirculating aquaculture system. J. World. Aquacult.
548 **40**, 513-521.

549 Alarcos, A. J.; Etchegoin, J. A.; Cremonte, F., 2008: Redescription of *Bacciger*
550 *microacetabularis* (Martorelli et Suriano, 1983) nov comb. parasitizing *Paralichthys*
551 *orbignyanus* (Pisces, Paralichthyidae) from Argentina. Acta Parasitol. **53**, 365-368.

552 Almeida, L.C.; Lundstedt, L.M.; Moraes, G., 2006. Digestive enzyme responses of
553 tambaqui (*Colossoma macropomum*) fed on different levels of protein and lipid. Aquacult.
554 Nutr. **12**, 443-450.

555 Alvarez-González, C. A.; Cervantes-Trujano, M.; Tovar-Ramírez, D.; Conklin, D.
556 E.; Nolasco, H.; Gisbert, E.; Piedrahita, R., 2006: Development of digestive enzymes in
557 California halibut *Paralichthys californicus* larvae. Fish Physiol. Biochem. **31**, 83-93.

558 Alvial, A.; Manríquez, J., 1999: Diversification of flatfish culture in Chile.
559 Aquaculture **176**, 65-73.

560 Asgeirsson, B.; Fox, J.W.; Bjarnason, J., 1989: Purification and characterization of
561 trypsin from the poikilotherm *Gadus morhua*. Eur. J. Biochem. **180**, 85-94.

562 Bambill, G. A.; Oka, M.; Radonić, M.; López, A. V.; Müller, M. I.; Boccanfuso, J.
563 J.; Bianca, F. A., 2006: Broodstock management and induced spawning of flounder
564 *Paralichthys orbignyanus* (Valenciennes, 1839) under a closed recirculated system. Rev.
565 Biol. Mar. Oceanogr. **41**, 45-55.

566 Berg, J. M.; Stryer, L.; Tymoczko, J. L., 2004: Bioquímica, 5ªed. Rio de Janeiro:
567 Guanabara Koogan, p 1104.

568 Bezerra, R. S.; Lins, E. L. F.; Alencar, R.B.; Paiva, P. M. G.; Chaves, M. E. C.;
569 Coelho, L. C. B. B.; Carvalho Jr., L. B., 2005: Alkaline proteinase from intestine of Nile
570 tilapia (*Oreochromis niloticus*). Process. Biochem. **40**, 1829–1834.

571 Bezerra, R. S.; Santos, J. F.; Paiva, P. M. G.; Correia, M. T. S.; Coelho, L. C. B. B.;
572 Vieira, V. L. A.; Carvalho Jr., L. B., 2001: Partial purification and characterization of a
573 thermostable trypsin from pyloric caeca of tambaqui (*Colossoma macropomum*). J. Food
574 Biochem. **25**, 199-210.

575 Bianchini, A.; Robaldo, R. B.; Sampaio, L. A., 2010. Cultivo do linguado
576 (*Paralichthys orbignyanus*), in: Baldisserotto, B., Gomes, L.C. (Eds.), Espécies nativas
577 para piscicultura no Brasil, segunda ed. Editora UFSM, Santa Maria, pp. 559-587.

578 Bianchini, A.; Wasielesky, Jr. W.; Miranda, K C., 1996: Toxicity of nitrogenous
579 compounds to juveniles of flatfish *Paralichthys orbignyanus*. Bull. Environ. Contam.
580 Toxicol. **56**, 453-459.

581 Brody, T., 1994: Nutritional Biochemistry. USA: Academic Press, 1994, pp 657.

582 Buarque, D. S.; Castro, P. F.; Santos, F. M. S.; Lemos, D.; Carvalho-Jr, L. B.;
583 Bezerra, R. S., 2009: Digestive peptidases and proteinases in the midgut gland of the pink
584 shrimp *Farfantepenaeus paulensis* (Crustacea, Decapoda, Penaeidae). Aquacult. Res. **40**,
585 861-870.

586 Campos, V. F.; Robaldo, R. B.; Deschamps, J. C.; Seixas, F. K.; McBride, A. J. A.;
587 Marins, L. F.; Okamoto, M.; Sampaio, L. A.; Collares, T.; 2010: Neuropeptide Y gene
588 expression. Around meal time in the Brazilian flounder *Paralichthys orbignyanus*. J.
589 Biosci. **37**, 1-6.

590 Cancre, I.; Ravallee, R.; Van Wormhoudt, A.; Stenverg, E.; Gildberg, A. L.; Le
591 Gal, Y., 1999: Secretagogues and growth factor in fish and crustacean protein
592 hydrolysates. Mar. Biotechnol. **1**, 489-494.

593 Cara, B.; Moyano, F.; Bruno, G.; Manuel, Y., 2007: Development of a novel
594 casein-protamine based microparticles for early feeding of fish larvae: In vitro evaluation.
595 J. Microencapsulation **24**, 505-514.

596 Castillo-Yañez, F. J.; Pacheco-Aguilar, R.; García-Carreño, F. L.; Navarrete-Del
597 Toro, M. A.; López, M. A., 2006: Purification and biochemical characterization of
598 chymotrypsin from the viscera of Monterey sardine (*Sardinops sagax caeruleus*). Food
599 Chem. **99**, 252-259.

600 Cazorla, A. L., 2005: On the age and growth of flounder *Paralichthys orbignyanus*
601 (Jenyns, 1842) in Bahía Blanca Estuary, Argentina. Hidrobiología **537**, 81-87.

602 Cazorla, A. L.; Forte, S., 2005: Food and feeding habits of flounder *Paralichthys*
603 *orbignyanus* (Jenyns, 1842) in Bahía Blanca Estuary, Argentina. Hydrobiol. **549**, 251-257.

604 Cerqueira, V. R., 2005: Egg development of *Paralichthys orbignyanus*
605 (Valenciennes, 1839). Braz. Arch. Biol. Technol. **48**, 459-465.

606 Champe, P. C.; Harvey, R. A.; Ferrier, D. R., 2009: Bioquímica Ilustrada, 4ª ed.,
607 Artmed, Porto Alegre.

608 Cousseau, B., Perrotta, R.G., 1998: Peces marinos de Argentina. Biología,
609 distribución, pesca. Ed. Instituto Nacional de Investigación y Desarrollo Pesquero
610 (INIDEP), Mar del Plata, Argentina, p 163.

611 Davies, A. J.; Amado, L. L.; Cook, R. T.; Bianchini, A.; Eiras, J. C., 2008:
612 Potential environmental and host gender influences on prevalence of *Haemogregarina*
613 *platessae* (Adeleorina: Haemogregarinidae) and suspected *Haemohormidium terraenovae*
614 (incertae sedis) in Brazilian flounder from the Patos Lagoon Estuary, southern Brazil.
615 Folia. Parasitol. **55**, 161-170.

616 De Vecchi, S.; Coppes, Z., 1996: Marine fish digestive proteases - relevance to
617 food industry and the southwest Atlantic region - a review. J. Food Biochem. **20**, 193-214.

618 Deng, J.; Mai, K.; Ai, Q.; Zhang, W.; Tan, B.; Xu, W.; Liufu, Z., 2010: Alternative
619 protein sources in diets for japonese flounder *Paralichthys olivaceus* (Temminck and
620 Schlegel): II. Effects on nutrient digestibility and digestive enzyme activity. Aquacult. Res.
621 **41**, 861-870.

622 Einarsson, S.; Davies, P. S.; Talbot, C., 1996: The effect of feeding in the secretion
623 of pepsin, trypsin and chymotrypsin in the Atlantic salmon, *Salmo salar* L. Fish.
624 Physiol.Biochem. **15**, 439-446.

625 Eiras, J. C.; Júnior, J. P.; Sampaio, L. A.; Robaldo, R.; Abreu, P. C., 2007:
626 Myxobolus sp. can cause in vivo myoliquefaction in the host *Paralichthys orbignyanus*
627 (Osteichthyes, Paralichthyidae). Dis. Aquat. Organ. **77**, 255-258.

628 Fange, I. S.; Chiou, S. F., 1989: Effects of salinity on the actives of digestive
629 proteases from the tilapia fish, *Oreochromis niloticus* in different culture environments.
630 Comp. Biochem. Physiol. **93A**, 439-443.

631 FAO. 2010. Global Aquaculture Production 1950-2010. Fisheries global
632 information system..

633 Figueiredo, J. L.; Menezes, N. A., 2000: Manual de peixes marinhos do sudeste do
634 Brasil (Handbook of marine fish in southeastern Brazil). Museu de zoologia, Universidade
635 de São Paulo, São Paulo, p 116.

636 Freitas-Júnior, A. C. V.; Costa, H. M. S.; Icimoto, M. Y.; Hirata, I. Y.; Marcondes,
637 M.; Carvalho Jr, L. B.; Oliveira, V.; Bezerra, R. S., 2012: Giant Amazonian fish pirarucu
638 (*Arapaima gigas*): Its viscera as a source of thermostable trypsin. *Food Chem.* **133**, 1596-
639 1602.

640 Furné, M.; Hidalgo, M. C.; López, A.; García-Gallego, M.; Morales, A. E.;
641 Domezain, A.; Domezainé, J.; Sanz, A., 2005: Digestive enzyme activities in Adriatic
642 sturgeon *Acipenser naccarii* and rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*. A comparative study.
643 *Aquaculture* **250**, 391-398.

644 Gildberg, A.; Overbo, K., 1990: Purification and characterization of pancreatic
645 elastase from atlantic cod (*Gadus morhua*). *Comp. Biochem. Physiol.* **97B**, 775-782.

646 Gonzalez, T.; Robert-Badouy, J., 1996: Bacterial aminopeptidases: Properties and
647 functions. *FEMS Microbiol. Rev.* **18**, 319-344.

648 Guartatanga, R. I., 1997. Manual sobre la reproducción y larvicultura del lenguado:
649 *Paralichthys woolmani*. Fundación CENAIM-ESPL/JICA. Ecuador: Guayaquil, p 31.

650 Gupta, R.; Beg, Q. K.; Larenz, P., 2002: Bacterial alkaline proteases: molecular
651 approaches and industrial applications. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **59**, 15-32.

652 Haard, N. F.; Simpson, B. K.; 1994: Protease from aquatic organisms and their uses
653 in the sea food industry. In: *Fisheries Processing: Biotechnological Applications*. Eds: A.
654 M. Martin, London: Chapman & Hall, p 132–154.

655 Henre, G.I.; Mommsen, T.P.; Krogdahl, A., 2002: Carbohydrates in fish nutrition:
656 effects on growth, glucose metabolism and hepatic enzymes. *Aquacult. Nutr.* **8**, 175-194.

657 Hidalgo, M. C.; Urea, E.; Sanz, A., 1999: Comparative study of digestive enzymes
658 in fish with different nutritional habits. Proteolytic and amylase activities. *Aquaculture*
659 **170**, 267-283.

660 IBAMA. 2007. Estatística 2005-2007. .

661 ITIS. Integrated Taxonomic Information System. 2013. .

662 Johnvesly, B.; Naik, G.R.; 2001: Studies on production of thermostable alkaline
663 protease from thermophilic and alkaliphilic *Bacillus* s. JB-99 in a chemically defined
664 medium. *Process. Biochem.* **37**, 139-144.

665 Kim, M.; Jeong, Y., 2012: Purification and characterization of a trypsin-like
666 protease from flatfish (*Paralichthys olivaceus*) intestine. *J. Food Biochem.* 1-10.

667 Kishimura, H.; Tokuda, Y.; Klomklao, S.; Benjakul, S.; Ando, S., 2006: Enzymatic
668 characteristics of trypsin from pyloric ceca of spotted mackerel (*Scomber australasicus*).
669 *J. Food Biochem.* **30**, 466-477.

670 Kitamikado, M.; Tachino, S., 1960: Studies on the digestive enzymes of rainbow
671 trout-II, Proteases. *Bull. Jap. Soc. Sci. Fish.* **26**, 685-690.

672 Klein, B.; Le Moullac, G.; Sellos, D.; Van Wormhoudt, A.; 1996: Molecular
673 cloning and sequencing of trypsin cDNAs from *Penaeus vanammei* (Crustacea,
674 Decapoda): use in assessing gene expression during the moult cycle. *Int. J. Biochem. Cell.*
675 *Biol.* **28**, 551-563.

676 Klomklao, S., 2008: Digestive proteinases from marine organisms and their
677 applications. *Songklanakarin J. Sci. Technol.* **30**, 37-46.

678 Klomklao, S.; Benjakul, S.; Visessanguan, W.; Kishimura, H.; Simpson, B. K.,
679 2007: Purification and characterization of trypsins from the spleen of skipjack tuna
680 (*Katsuwonus pelanis*). *Food. Chem.* **100**, 1580-1589.

681 Kolkovski, S., 2001: Digestive enzymes in fish larvae and juveniles – implications
682 and applications to formulated diets. *Aquaculture* **200**, 181-201.

683 Kristjánsson, M. M., 1991: Purification and characterization of trypsin from the
684 pyloric caeca of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *J. Agric. Food. Chem.* **39**, 1738-
685 1742.

686 Kuriki, T.; Imanaka, T., 1999: The concept oh the α -amylase family: structural
687 similarity and common catalytic mechanism. J. Biosci. Bioeng. **87**, 557-565.

688 Kurokawa, T.; Uji, S.; Suzuki, T., 2005: Identification of pepsinogen gene in the
689 genome of stomachless fish, *Takifugu rubripes*. Comp. Biochem. Physiol. **140B**, 133-140.

690 Kuz'mina, V. V., 1977: Peculiarities of membrane digestion in freshwater teleosts.
691 J. Ichthyol. **17**, 99-107.

692 Lee, C. S.; Ostrowski A. C., 2001: Current status of marine finfish larviculture in
693 the United States. Aquaculture **200**, 89-109.

694 López-López, S.; Nolasco, H.; Villarreal-Colmenares, H.; Civera-Cerecedo H.,
695 2005: Digestive enzyme response to supplemental ingredients in practical diets for
696 juveniles freshwater crayfish *Cheraz quadricarinatus*. Aquacult. Nutr. **11**, 79-85.

697 Lovell, T. 1989: Nutrition and feeding of fish. Chapman & Hall, p 260.

698 Lundstedt, L. M.; Melo, J. F. B.; Moraes, G., 2004: Digestive enzymes and
699 metabolic profile of *Pseudoplatystoma corruscans* (Teleostei: Siluriformes) in response to
700 diet composition. Comp. Biochem. Physiol. **137B**, 331-339.

701 Marcuschi, M.; Espósito, T. S.; Machado, M. F. M.; Hirata, I. Y.; Machado, M. F.
702 M.; Silva, M. V.; Carvalho Jr., L. B.; Oliveira, V.; Bezerra, R. S., 2010: Purification,
703 characterization and substrate specificity of a trypsin from the Amazonian fish tambaqui
704 (*Colossoma macropomum*). Biochem. Biophys. Res. Commun. **396**, 667-673.

705 Martinez, A.; Olsen, R. L., 1989: Characterization of pepsins from cod. U.S.
706 Biochemistry, 16, Corporation (Editorial comments), p 22-23.

707 Martinez, G. M.; Bolker, J. A., 2003: Embryonic and Larval Staging of Summer
708 Flounder (*Paralichthys dentatus*) J.Morphol. **255**, 162-176.

709 Meier, K. M.; Figueiredo, M. A.; Kamimura, M. T.; Laurino, J.; Maggioni, R.;
710 Pinto, L. S.; Dellagostin, A. O.; Tesser, M. B.; Sampaio, L. A.; Marins, L. F., 2009:

711 Increased growth hormone (GH), growth hormone receptor (GHR), and insulin-like growth
712 fator I (IGF-I) gene transcription after hyperosmotic stress in the Brazilian flounder
713 *Paralichthys orbignyanus*. Fish. Physiol. Biochem. **35**, 501–509.

714 Ministério da Pesca e Aquicultura, 2010: Boletim estatístico da pesca e aquicultura.
715 p.34.

716 Munilla-Morán, R.; Saborido-Rey, F., 1996: Digestive enzymes in marine species.
717 I. Proteinase activities in gut from redbfish (*Sebastes mentella*), seabream (*Sparus aurata*)
718 and turbot (*Scophthalmus maximus*). Comp. Biochem. Physiol. **113B**, 395-402.

719 Nelson, D. L.; Cox, M. M., 2004: Lenhinger: Princípios de Bioquímica. 4ª ed. São
720 Paulo, Sarvier, p 1119.

721 Nelson, J.S., 2006: Fishes of the world, fourth ed., Canada:. John Wiley & Sons,
722 Inc., Hoboken p.87.

723 Norris, E. R.; Elam, D. W., 1940: Preparation and properties of crystalline salmon
724 pepsin. J. Biol. Chem. **134**, 443-454.

725 Okamoto, M. H.; Sampaio, L. A., 2012: Sobrevivência e crescimento de juvenis do
726 linguado *Paralichthys orbignyanus* criados em diferentes temperaturas. Atlântica **34**, 57-
727 61.

728 Parra, A. M.; Rosas, A.; Lazo, J. P.; Viana, M. T., 2007: Partial characterization of
729 the digestive enzymes of Pacific bluefin tuna *Thunnus orientalis* under culture condition.
730 Fish. Physiol. Biochem. **33**, 223-231.

731 Radonic, M.; Macchi, G. J., 2009: Gonadal Sex differentiation in cultured juvenile
732 flounder, *Paralichthys orbignyanus* (Valenciennes, 1839). J. World Aquacult. Soc. **40**,
733 130-133.

734 Rao, M. B.; Tanksale, A. M.; Ghatge, M. S.; Deshpande, V. V., 1998: Molecular
735 and biotechnological aspects of microbial proteases. Microbiol. Mol. Biol. R. **62**, 597-635.

736 Ren, M.; Ai, Q.; Mai, K.; Ma, H.; Wang, X., 2011: Effect of dietary carbohydrate
737 level on growth performance, body composition, apparent digestibility coefficient and
738 digestive enzyme activities of juvenile cobia, *Rachycentron canadum* L. *Aquacult. Res.* **42**,
739 1467-1475.

740 Robaldo, R. B.; Rodrigues, R. V.; Okamoto, M. H.; Sampaio, L. A., 2012:
741 Processing yield of wild-caught and indoor-reared Brazilian flounder *Paralichthys*
742 *orbignyanus*. *J. Appl. Ichthyol.* 1-3.

743 Robaldo, R.; Pereira Jr, J.; Sampaio, L. A.; Kütter, V.; Bianchini, A., 2002:
744 Oviposição e desenvolvimento inicial de *Caligus* sp. (Copepoda: Caligidae) um parasita
745 de juvenis do linguado *Paralichthys orbignyanus* (Teleostei: Paralichthyidae) em cativeiro.
746 *Atlântica.* **24**, 31-34.

747 Romano, L. A.; Sampaio, L. A.; Tesser, M. B., 2012: Micobacteriose por
748 *Mycobacterium marinum* em “linguado” *Paralichthys orbignyanus* e em “barber goby”
749 *Elacatinus figaro*: diagnóstico histopatológico e imuno-histoquímico. *Pesq. Vet. Bras.* **32**,
750 254-258.

751 Rosas, J.; Arana, D.; Cabrera, T.; Millán, J.; Jory, D., 1999: The potential use of the
752 Caribbean flounder *Paralichthys tropicus* as an aquaculture species. *Aquaculture* **176**, 51-
753 54.

754 Rotta, M. A., 2003: Aspectos gerais da fisiologia e estrutura do sistema digestivo
755 dos peixes relacionados a piscicultura. *EMBRAPA* **53**, 1-44.

756 Rungruangsak-Torrissen, K.; Stien, L. H.; Daae, B. S.; Vagseth, T.; Thorsheim, G.
757 B.; Tobin, D.; Ritola, O., 2009: Different dietary levels of protein to lipid ratio affected
758 digestive efficiency, skeletal growth, and muscle protein in rainbow trout families.
759 *Scholarly Research Exchange.* **2009**, 1-13.

760 Rust, MB, 2002: Nutritional Physiology. In: Fish Nutrition. Eds: Elsevier Science,
761 San Diego, p 367-452.

762 Sainz, J. C.; García-Carreño, F. L.; Hernández-Cortés, P., 2004: *Penaeus vannamei*
763 isotrypsins: purification and characterization. *Comp. Biochem.* **138B**, 155-162.

764 Sampaio, L. A.; Bianchini, A., 2002. Salinity effects on osmoregulation and growth
765 of the euryhaline flounder *Paralichthys orbignyanus*. *J. exp. Mar. Biol. Ecol.* **296**, 187-
766 196.

767 Sampaio, L. A.; Bianchini, A.; Cerqueira, V. R., 2001: Growth of juveniles
768 Brazilian flounder, *Paralichthys orbignyanus* cultured in different salinities, *J. Appl.*
769 *Aquacult.* **11**, 67-75.

770 Sampaio, L. A.; Robaldo, R. R.; Bianchini, A., 2008: Hormone-induced ovulation,
771 natural spawning and larviculture of Brazilian flounder *Paralichthys orbignyanus*
772 (Valenciennes,1839). *Aquacult. Res.* **39**, 712-717.

773 Sanchez-Chiang, L.; Cisternas, E.; Ponce, O., 1987: Partial purification of pepsins
774 from adult and juvenile salmon fish (*Oncorhynchus keta*). Effect of NaCl on proteolytic
775 activities. *Comp. Biochem. Physiol.* **87B**, 793-797.

776 Sanchez-Chiang, L.; Ponce, O., 1982: Purificaciones y propiedades de
777 pepsinógeno y pepsina de *Merluccius gayi*. *Sociedad de Biología Concepción.* **53**, 129-
778 143.

779 Sánchez-Paz, A.; García-Carreño, F.; Muhlia-Almazán, A.; Hernández-Saavedra,
780 N.Y.; Yepiz-Plascencia, G., 2003: Differential expression of trypsin mRNA in the white
781 shrimp (*Penaeus vannamei*) midgut gland under starvation condition. *J. Exp. Mar. Biol.*
782 *Ecol.* **292**, 1–17.

783 Seixas Filho, J. T., 2003: Uma revisão sobre o papel do carboidrato e da proteína no
784 metabolismo de peixes com hábitos alimentar carnívoro e onívoro. *Augustus* **9**, 32-51.

785 Silveira, M. P. M.; Cousin, J. C. B.; Haimovici, H., 1995: Estrutura Ovária e
786 Testicular do Linguado *Paralichthys orbignyanus* (Valenciennes, 1839). *Atlântica* **17**, 135-
787 152.

788 Simpson, B.K.; Haard, N.F., 1987: Trypsin and trypsin-like enzymes from the
789 stomach less cunner (*Tautogolabrus adspersus*): catalytic and other physical
790 characteristics. *J. Agric. Food. Chem.* **35**, 652-656.

791 Simpson, B.K, 2000: Digestive Proteases from Marine Animals. In: *Seafood*
792 *Enzymes*. Eds: Marcel Dekker, New York, NY, p 191– 213.

793 Singh, P.; Benjakul, S.; Maqsood, S.; Kishimura, H., 2011: Isolation and
794 characterisation of collagen extracted from the skin of striped catfish (*Pangasianodon*
795 *hypophthalmus*). *Food Chem.* **124**, 97–105.

796 Souza, A. A. G.; Amaral, I. P. G.; Espírito Santo, A. R.; Carvalho Jr., L. B.;
797 Bezerra, R. A., 2007: Trypsin-like enzyme from intestine and pyloric caeca of spotted
798 goatfish (*Pseudupeneus maculatus*). *Food Chem.* **100**, 1429-1434.

799 Sunde, J.; Eliane, S. A.; Rustad, A.; Jensen, H. B.; Opstvedt, J.; Nygard, E.;

800 Thatcher, V.E.; Pereira Jr. J., 2004: *Brasilochondria riograndensis* gen. nov. sp.
801 nov. (Copepoda, Chondracanthidae) a parasite of flounder of Rio Grande do Sul State,
802 Brazil. *Rev. Bras. Zool.* **21**, 515-518.

803 Twining, S. S.; Alexander, P. A.; Glick, D. M., 1983: A pepsinogen from rainbow
804 trout. *Comp. Biochem. Physiol.* **75B**, 109-112.

805 Velloso, A. L.; Pereira Jr, J.; Cousin, J. C. B., 2005: *Therodamas fluviatilis*
806 (Copepoda: Ergasilidae), parasito de *Paralichthys orbignyanus* (Teleostei: Aralichthyidae)
807 do Estuário da Lagoa dos Patos e Costa Adjacente, RS, Brasil. *B. Inst. Pesca.* **3**, 65-71.

808 Wang, Q.; Gao, Z. X.; Zhang, N.; Shi, Y.; Xie, X. L.; Chen, Q. X., 2010:
809 Purification and characterization of trypsin from the intestine of hybrid tilapia
810 (*Oreochromis niloticus* x *O.aureus*). J. Agric. Food. Chem. **58**, 655-659.

811 Wasielesky, W.; Bianchini, A.; Miranda, K., 1998: Tolerancia a la temperatura de
812 juveniles de lenguado *Paralichthys orbignyanus*. Frente Maritimo **17**, 43-48.

813 Whitaker, JR, 1994: Principles of Enzymology for the Food Sciences, 2nd ed.
814 Marcel Dekker, New York, NY, p 63–115.

815 Wilson, R.P., 1994: Utilization of dietary carbohydrate by fish. Aquaculture **124**,
816 67-80.

817 Xiong, D. M.; Xie, C. X.; Zhang, H. J.; Liu, H. P., 2009: Digestive enzymes along
818 digestive tract of a carnivorous fish *Glyptosternum maculatum* (Sisoridae, Siluriformes).
819 J. Anim. Physiol. Anim. Nutr. **95**, 56-64.

820 Yamamoto, T.; Unuma, T.; Akiyama, T., 2000: The influence of dietary protein and
821 fat levels on tissue free amino acid levels of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*).
822 Aquaculture **180**, 353-372.

823

824

825

826

827

828

829

830

831

832

833 **Artigo anexo**

834 **Caracterização das enzimas digestórias do linguado *Paralichthys orbignyanus***

835 ^{1,2} Fernanda Braz Candiotto, ³ Augusto César Vasconcelos De Freitas Júnior, ³

836 Robson Coelho de Araujo Neri, ³ Ranilson de Souza Bezerra, ^{1,2} Luís André Sampaio, ^{1,2}

837 Marcelo Borges Tesser

838 ¹*Programa de Pós Graduação em Aquicultura, Universidade Federal do Rio*

839 *Grande, Rio Grande, Brasil; ²Universidade Federal do Rio Grande – FURG, Instituto de*

840 *Oceanografia, Laboratório de Piscicultura Estuarina e Marinha, Rio Grande, Brasil;*

841 ³*Laboratório de Enzimologia (LABENZ), Departamento de Bioquímica*

842 *(CCB), Universidade Federal de Pernambuco, Recife, Brasil.*

843

844

845

Resumo

846 No Brasil a principal espécie de linguado encontrada é o *Paralichthys orbignyanus*. Esta
847 espécie já foi um recurso pesqueiro importante no sul do país, no entanto, a pesca
848 encontra-se estagnada. Assim, a produção deste linguado pode ser uma alternativa para
849 aumentar a oferta de pescado na região, devido às características que apontam a viabilidade
850 de criação como bom crescimento em água salgada e salobra, reprodução e larvicultura em
851 cativeiro dominadas. Entretanto, ainda existe uma grande carência de pesquisas
852 relacionadas à fisiologia digestória da espécie. Para isso foi determinada e caracterizada a
853 atividade de enzimas digestórias presentes no fígado, intestino e estômago do linguado
854 (*Paralichthys orbignyanus*), através de substratos inespecíficos e específicos, além de
855 inibidores específicos. Os parâmetros físico-químicos também foram determinados
856 utilizando substratos específicos. Atividade enzimática presente no extrato bruto do
857 intestino foi: Azocaseína ($0,3645 \pm 0,25 \text{ mU mg}^{-1}$), BApNA ($0,5119 \pm 0,2 \text{ mU mg}^{-1}$),
858 SApNA ($2,6281 \pm 1,8 \text{ mU mg}^{-1}$), Leu-p-Nan ($0,9709 \pm 0,83 \text{ mU mg}^{-1}$), amido (sem
859 atividade). Atividade enzimática presente no extrato bruto do fígado: Azocaseína ($0,27 \pm$
860 $0,01 \text{ mU mg}^{-1}$), BApNA (sem atividade), SApNA ($0,7 \pm 0,08 \text{ mU mg}^{-1}$), Leu-p-Nan (sem
861 atividade), amido ($33,25 \pm 0,8 \text{ mU mg}^{-1}$). O efeito dos inibidores específicos sobre a
862 atividade residual das peptidases presentes no extrato bruto do intestino apresentou o
863 seguinte perfil: PMSF (BapNA= $52 \pm 2,3$; SapNa= $42 \pm 1,2$; Leu-p-Nan= $43 \pm 1,4\%$), TLCK
864 (BapNA= $33 \pm 1,8$; SapNa= $45 \pm 0,3$; Leu-p-Nan= $44 \pm 4,1\%$), TPCK (BapNA= $100 \pm 1,2$;
865 SapNa= $79 \pm 4,5$; Leu-p-Nan= $60 \pm 1,8\%$), Benzamidina (BapNA= $41 \pm 2,3$; SapNa= $58 \pm 0,5$;
866 Leu-p-Nan= $40 \pm 1,2\%$). O pH ótimo observado para a atividade de tripsina, quimotripsina,
867 leucino aminopeptidase, amilase e pepsina foi pH 9,5, 9, 8, 7,5 e 3,5, respectivamente. A
868 temperatura ótima observada para a atividade destas enzimas foi 50, 50, 50, 40 e 45°C,
869 respectivamente. Alanina e Leucina aminopeptidases apresentaram uma alta atividade

870 comparada à outras aminopeptidases avaliadas. A tripsina e leucino aminopeptidase
871 demonstraram ser termoestáveis até 70 e 50°C, respectivamente, características que
872 indicam a possibilidade de aplicação biotecnológica.

873

874

875

876

877

878

879

880

881

882

883

884

885

886

887

888

889

890

891

892

893

894

895

896

897

898

899

900

901

Abstract

902 In Brazil, the main species of flounder is *Paralichthys orbignyanus*. This species was an
903 important fishery resource in the South. However, fishing is stagnant. Thus, the production
904 of this flounder can be an alternative to increase the supply of fish in the region, due to the
905 characteristics that indicate the feasibility of creating such good growth in saltwater and
906 brackish, captive breeding and larval rearing dominated. However, there is still a lack of
907 information related to the physiology digestive of the species. It this was investigated and
908 characterized the activity of digestive enzymes present in the liver, intestine and stomach
909 of the flounder (*Paralichthys orbignyanus*) through nonspecific and specific substrates, in
910 addition to specific inhibitors. The physico-chemical parameters were determined using
911 specific substrates. Enzyme activity present in the crude extract of the intestine was:
912 azocasein (0.3645 ± 0.25 mU mg⁻¹), BApNA (0.5119 ± 0.2 mU mg⁻¹), Sapna ($2.6281 \pm$
913 1.8 mU mg⁻¹), Leu-p-Nan (0.9709 ± 0.83 mU mg⁻¹), starch (0). Enzyme activity present
914 in the crude extract of the liver: azocasein (0.27 ± 0.01 mU mg⁻¹), BApNA (0), Sapna (0.7
915 ± 0.08 mU mg⁻¹), Leu-p-Nan (0), starch (33.25 ± 0.8 mU mg⁻¹). The effect of specific
916 inhibitors on the residual activity of peptidases present in the crude extract of the intestine
917 showed the following profile: PMSF (BAPNA = 52 ± 2.3 ; Sapna = 42 ± 1.2 ; -Leu-Nan p =
918 43 ± 1 , 4%), TLCK (BAPNA = 33 ± 1.8 ; Sapna = 45 ± 0.3 , p-Leu-Nan = 44 ± 4.1 %),
919 TPCK (BAPNA = 100 ± 1.2 ; Sapna = 79 ± 4.5 , Leu-p-Nan = 60 ± 1.8 %), Benzamidine
920 (BAPNA = 41 ± 2.3 ; Sapna = 58 ± 0.5 , p-Leu-Nan = 40 ± 1.2 %). The optimum pH
921 observed for the activities of trypsin, chymotrypsin, leucino aminopeptidase, amylase and
922 pepsin were pH 9.5, 9, 8, 7.5 and 3.5, respectively. The optimum temperature for the
923 observed activities of these enzymes was 50, 50, 50, 40 and 45 ° C respectively. Alanine
924 and leucine aminopeptidase showed higher activity compared to other aminopeptidases
925 evaluated. Trypsin and leucine aminopeptidase shown to be thermostable up to 70 ° C and

926 50 respectively. Characteristics that indicate the possibility of biotechnological
927 applications.

928

929

930

931

932

933

934

935

936

937

938

939

940

941

942

943

944

945

946

947

948

949

950

951 **1. Introdução**

952 O linguado (*Paralichthys orbignyanus*) é uma espécie de peixe nativa de áreas
953 costeiras e estuarinas que vão desde o Rio de Janeiro no Brasil até Mar del Plata, na
954 Argentina, sendo mais abundantes no sul do Brasil (Figueiredo e Menezes, 2000). Recurso
955 pesqueiro importante para região sul do país, porém nos últimos anos a pesca desta espécie
956 encontra-se estagnada (MPA, 2010). Desta forma a produção em cativeiro é apontada
957 como alternativa para incrementar a oferta de pescado (Sampaio et al. 2008).

958 Alguns trabalhos apontam boas perspectivas para a criação desta espécie, pois
959 apresentam ótimas características como bom crescimento em água salgada ou salobra
960 (Sampaio et al. 2001), reprodução em cativeiro e larvicultura dominadas (Sampaio et al.
961 2008), além do elevado valor comercial. Porém, existe uma grande carência de pesquisas
962 relacionadas à fisiologia digestória da espécie.

963 Devido alimentação estar entre os maiores custos de produção na aquicultura,
964 muitas vezes representando 50% do total das despesas (Alam e Watanabe, 2009), é
965 importante fornecer rações balanceadas para atender o crescimento animal e minimizar os
966 gastos da produção (Cho et al. 2003), além de evitar resíduos nitrogenados no ambiente, os
967 quais são oriundos de proteínas não digeridas pelos animais (Gatlin, 2010). Para a correta
968 elaboração destes alimentos, é fundamental conhecer a atividade enzimática e os processos
969 digestórios de cada espécie (Kolkovski, 2001; López-López et al. 2005).

970 A tripsina, a quimotripsina e as aminopeptidases são peptidases digestórias de
971 grande importância na digestão dos peixes (Sánchez-Paz et al. 2003; Gonzalez e Robert-
972 Baudouy, 1996). Estas são produzidas no pâncreas sob a forma de zimogênio, sendo
973 ativadas pela ação da enteroquinase, transformando-o em tripsina ativa. A partir disto, a
974 enteroquinase juntamente com as tripsinas (recém - ativadas) promovem um efeito cascata,

975 responsável pela ativação de novos tripsinogênios e outros zimogênios como
976 quimotripsinogênio, procarboxipeptidase, proelastase e profosforilase (Brody, 1994).

977 Para a digestão dos carboidratos, a enzima mais comum é a amilase, que é
978 produzida pelo pâncreas (Krogdahl et al., 2005). A atividade amilolítica tem sido
979 observada em vários teleósteos herbívoros, onívoros e carnívoros, em diferentes regiões do
980 aparelho digestório, principalmente, nos cecos pilóricos, no estômago, no fígado, no
981 pâncreas e na região bucofaríngeana (Hidalgo, 1999; Seixas Filho, 2003; Deng et al., 2010;
982 Ren et al., 2011).

983 Outro aspecto relevante para este estudo é a utilização de vísceras para a obtenção
984 de biomoléculas passíveis de aplicações em processos industriais, como na indústria de
985 detergentes, (Bezerra et al. 2001; Silva et al., 2011; Freitas Jr. et al. 2012). Este insumo é
986 produzido em grande quantidade e possuem enzimas e outras biomoléculas com
987 propriedades únicas, devido à grande diversidade biológica dos peixes (De Vecchi e
988 Coppes, 1996).

989 Assim, este estudo tem como objetivo identificar e caracterizar as enzimas
990 digestórias no fígado, estômago e intestino no linguado *Paralichthys orbignyanus*,
991 contribuindo desta forma com informações relevantes sobre a fisiologia digestória da
992 espécie, assim como observar se essas enzimas apresentam características interessantes
993 para possíveis aplicações biotecnológicas.

994 **2. Material e Métodos**

995 *2.1. Material Biológico*

996 Foram utilizados 41 juvenis da espécie *Paralichthys orbignyanus* (linguado),
997 produzidos no Laboratório de Piscicultura Estuarina e Marinha (EMA – FURG) de acordo
998 com os protocolos alimentares estabelecidos por Sampaio et al. (2008). Estes animais
999 foram anestesiados com benzocaína (50 ppm) e eutanasiados por deslocamento cervical e

1000 mantidos em gelo para não ocorrer hidrólise do tecido. O peso médio dos 41 peixes
1001 utilizados foi de $112,10 \pm 34,93$ g. Imediatamente, foram coletados o estômago, o intestino
1002 e o fígado sobre gelo, pesados em balança digital Ohaus Adventurer de precisão 0,0001g e
1003 congelados em gelo seco. As amostras foram enviadas para a Universidade Federal de
1004 Pernambuco (UFPE) para extração e caracterização enzimática. Todos os reagentes usados
1005 para os ensaios foram obtidos da empresa Sigma (St. Louis, MO, USA) e Merck
1006 (Darmstadt, Alemanha).

1007 *2.2. Extração enzimática e determinação de proteína total solúvel*

1008 Os órgãos coletados foram homogeneizados em concentração de 1g/mL (p/v) de
1009 tecido em uma solução de NaCl 0,15M utilizando o agitador mecânico (IKA RW 20
1010 digital) com 615 rpm. Os tecidos homogeneizados, então, foram centrifugados a 10.000 g
1011 durante 10 minutos para remover lipídios e restos de tecido. Os sobrenadantes (extratos
1012 enzimáticos brutos) foram armazenados a - 20°C para posteriores análises. A proteína total
1013 solúvel foi determinada seguindo o procedimento descrito por Bradford (1976), utilizando
1014 albumina bovina como proteína padrão.

1015 *2.3. Ensaios enzimáticos não-específicos*

1016 Atividade proteolítica alcalina total foi determinada (triplicata) usando azocaseína
1017 (1%) dissolvida em tampão Tris-HCl 0,1M pH 8 (50µL), com extrato bruto do intestino
1018 (30µL) durante 60 minutos a 25°C (Bezerra et al., 2005). Em seguida 240µL de ácido
1019 tricloroacético (TCA 10%) foi adicionado para parar a reação. Após 10 minutos a amostra
1020 foi centrifugada a 8.000 xg por 5 min. O sobrenadante (70 µL) foi misturado com 1M de
1021 NaOH (130 µL) e absorbância medida em espectrofotômetro leitor de microplacas (Bio-
1022 Rad Model X-Mark™, USA) a 450 nm, comparado à um controle da reação, preparado de
1023 forma semelhante, substituindo-se o extrato bruto por NaCl 0,15M.

1024 Atividade proteolítica ácida total foi determinada (triplicata) de acordo com
1025 metodologia descrita por Khaled et al. (2011) com algumas modificações. Foi incubada
1026 uma mistura contendo 100µL de hemoglobina 2% (p/v) pH 2,5, com 50µL do extrato bruto
1027 de estômago e 350µL de tampão glicina-HCl 0,1M pH 2,5, por 30 minutos à 37°C. Após
1028 os 30 minutos foram adicionados 500µL de ácido tricloroacético 10% (p/v) e a mistura foi
1029 incubada por 15 min. a 25°C. Após esta etapa, a mistura foi centrifugada a 10.000 x g
1030 durante 10 min e a absorbância do sobrenadante foi medida a 280 nm. Um controle da
1031 reação foi realizado substituindo-se o extrato bruto por NaCl 0,15M na mistura da reação.
1032 Além disso, foi realizado um controle do extrato bruto substituindo-se a hemoglobina 2%
1033 por tampão glicina-HCl 0,1M pH 2,5 na mistura da reação

1034 Uma unidade (U) de atividade enzimática foi definida como a quantidade de
1035 enzima capaz de hidrolisar hemoglobina, ou azocaseína, produzindo 0.001 de mudança na
1036 absorbância, por minuto de reação.

1037 *2.4. Ensaio enzimático específico*

1038 A atividade para tripsina, quimotripsina e leucino aminopeptidase foram
1039 determinadas em microplacas de acordo com Buarque et al. (2010) utilizando o BApNA
1040 (N α -benzoil-DL-arginina-*p*-nitroanilida) 8mM, SApNA (succinil – alanina alanina prolina
1041 fenilalanina – *p* - nitroanilida) 4mM e Leu-*p*-Nan (leucina *p* nitroanilida) 8mM como
1042 substratos específicos para tripsina, quimotripsina e leucino aminopeptidase,
1043 respectivamente, utilizando DMSO (dimetil sulfóxido) como solvente. Todos os ensaios
1044 foram realizados em triplicata. Os extratos brutos do intestino dos linguados (30µL) foram
1045 incubados com 140µL do tampão Tris-HCl 0,1M, pH 8.0 e 30µL do substrato por um
1046 período de 15 min a 25°C. Logo após, as leituras da absorbância foram medidas e
1047 registradas usando o leitor de microplacas (Bio-Rad Model X-Mark™, USA) em 405nm de
1048 comprimento de onda. Uma unidade (U) de atividade foi definida como a quantidade de

1049 enzima necessária para produzir 1µmol de p-nitroanilida por minuto. A atividade
1050 específica foi expressa como unidades por miligrama de proteína.

1051 *2.5. Atividade das aminopeptidases*

1052 As atividades das aminopeptidases foram avaliadas usando o aminoacyl β-
1053 naftilamida (AA-NA), com os seguintes substratos: Alanina, Arginina, Leucina, Isoleucina,
1054 Prolina, Histidina, Tirosina, Glicina, e Serina. O procedimento adaptado por Oliveira et al.
1055 (1999) foi realizado por incubação do substrato 4,2mM (50mL), 50mM de fosfato de sódio
1056 como tampão (pH 7) e H₂O desionizada (50mL) a 37°C. Após o equilíbrio da temperatura,
1057 o extrato bruto do intestino (50mL) foi adicionado. Após 120 minutos, a reação foi
1058 interrompida pela adição de 1mg/mL do reagente Garnet (250mL) preparada com 0,2 M de
1059 acetato de sódio como tampão (pH 4,2), contendo 10% (p/v) de Tween 20. A absorvância
1060 foi medida a 525 nm e quantidade de b-naftilamina foi determinada usando uma curva
1061 padrão de b-naftilamina. A atividade foi expressa por unidades de peptidase por mg de
1062 proteína. Uma unidade da atividade enzimática foi determinada como a quantidade de
1063 enzima capaz de produzir 1 µmoL de β-naftilamina por minuto de reação.

1064 *2.6. Atividade amilolítica*

1065 A atividade amilolítica total foi baseada no método de Bernfeld (1955), utilizando
1066 solução de amido a 2% (p/v) como substrato. A reação consistiu na incubação de 20µL do
1067 extrato bruto do fígado e intestino com 125µL de tampão Tris-HCl 0.1M, pH 8 e 125µL de
1068 substrato a 37°C por 10 minutos. Em seguida, 30µL da solução foi incubada com DNSA
1069 (ácido 3,5 – dinitrossalicílico) a 100°C durante 10 minutos. Logo após o resfriamento,
1070 200µL da solução foram transferidos para a microplaca e a absorvância foi medida a
1071 570nm usando o leitor de microplacas (Bio-Rad Model X-Mark™, USA). Uma unidade de
1072 atividade de enzima é expressa em µg de maltose liberada a 37°C por minuto por mg de

1073 proteína. Para determinar a concentração de maltose liberada, foi usada uma curva de
1074 calibração utilizando maltose comercial.

1075 *2.7. Propriedades físico químicas*

1076 O efeito do pH e temperatura sobre a atividade proteolítica e amilolítica do extrato
1077 bruto do intestino, estômago e intestino do *P. orbignyana* foram avaliados utilizando os
1078 tampões Tris-HCl, citrato-fosfato e NaOH-glicina na concentração final de 0.1M, com pH
1079 variando 4,5 a 11,5 para atividade alcalina e 1,5 a 6,5 para atividade ácida e temperatura
1080 variando de 25 – 70°C para ambas atividades. A estabilidade térmica foi avaliada mediante
1081 análise da atividade enzimática a 25°C, após pré-incubação durante 30 minutos em
1082 temperaturas que variaram de 25 – 70°C (Bezerra et al. 2005).

1083 *2.8. Ensaios de inibição*

1084 Os inibidores seguintes foram preparados em DMSO na concentração de 8mM:
1085 fluoreto de fenilmetilsulfonil (PMSF – inibidor de serino peptidases), TLCK (tosil cetona
1086 lisina clorometil) e benzamidina (inibidores clássicos de tripsinas), TPCK (tosil fenilalanina
1087 clorometil cetona) um inibidor clássico de quimotripsinas (Bezerra et al. 2005). O EDTA
1088 (ácido etilenodiaminotetracético) foi utilizado como inibidor de metaloproteases e o β -
1089 mercaptoetanol como agente desnaturante. O inibidor tipo I de α -amilase obtido do vegetal
1090 *Triticum aestivum* foi preparado em água destilada na concentração de 1mg/mL.
1091 Triplicatas de misturas contendo extrato bruto do intestino (tripsina, quimotripsina e
1092 aminopeptidase) e fígado (amilase) e solução de inibidor, na proporção de 1:1, foram
1093 incubadas por 30 min. a 25°C. Após a incubação procedeu-se com os ensaios de atividade
1094 enzimática conforme descritos anteriormente. Foram realizados controles negativos do
1095 extrato enzimático e da reação substituindo o substrato por tampão e o extrato bruto por
1096 NaCl 0,15M, respectivamente. Um controle positivo (100%) foi realizado utilizando
1097 DMSO sem inibidores.

1098 2.9. *Estatística*

1099 Os resultados (média e desvio padrão) foram processados usando o programa
1100 Microcal Origin 6.0.

1101 **3. Resultados**

1102 A Tabela 1 mostra a atividade das peptidases digestórias e da atividade amilolítica
1103 do linguado (*P. orbignyanus*). A atividade da tripsina (BAPNA) e leucino-aminopeptidases
1104 (Leu-p-Nan) foram observadas no extrato bruto do intestino do linguado. A atividade da
1105 quimotripsina foi maior utilizando o substrato SAPNA, que contém mais de um
1106 aminoácido, do que o substrato Suc-Phe-p-Nan. A atividade enzimática utilizando
1107 substratos inespecíficos também foi observada, tanto atividade alcalina (azocaseína),
1108 quando atividade ácida (hemoglobina), no extrato bruto do intestino e estômago do
1109 linguado, respectivamente.

1110 Atividade amilolítica foi detectada apenas no extrato bruto do fígado, utilizando o
1111 substrato inespecífico amido (Tabela 2). Ainda neste extrato bruto, a atividade enzimática
1112 da quimotripsina foi detectada, utilizando o substrato SAPNA e atividade proteolítica total
1113 utilizando azocaseína.

1114 Na Tabela 3 é possível observar o efeito de alguns inibidores sobre as atividades
1115 enzimáticas de tripsina, quimotripsina e leucino-aminopeptidase nos extratos brutos do
1116 intestino do linguado. O inibidor das serino peptidases (PMSF) apresentou uma inibição
1117 nas três enzimas (tripsina=48%; quimotripsina=58%; leucino-aminopeptidase=57%), a
1118 benzamidina (tripsina= 59%; quimotripsina= 42%; leucino-aminopeptidase= 60%) e o
1119 TLCK (tripsina=67%; quimotripsina= 55%; leucino-aminopeptidase= 56%), ambos
1120 inibidores de tripsina, também inibiram as três enzimas. O TPCK, inibidor específico de
1121 quimotripsina, não inibiu a tripsina, porém inibiu 40% da atividade da leucino-
1122 aminopeptidase e 21 a atividade da quimotripsina.

1123 Na Tabela 4 é possível observar uma baixa inibição, mesmo utilizando duas
1124 concentrações do inibidor tipo I de α -amilase obtido do vegetal *Triticum aestivum*, no
1125 extrato bruto do fígado dos linguados (500 e 1000 $\mu\text{g/mL}$ = 26% e 36%), respectivamente.

1126 O efeito da temperatura sobre a atividade de tripsina, quimotripsina e leucino-
1127 aminopeptidase presentes no extrato bruto do intestino são mostrados na Figura 1A, 2A e
1128 3A, respectivamente. A atividade máxima das três enzimas foi observada a 50°C, embora
1129 mais de 80% de sua atividade máxima foi encontrada em uma faixa de 40-55°C para
1130 tripsina (Figura 1A), 35-50°C para quimotripsina (Figura 2A) e 40-55°C para leucino-
1131 aminopeptidase (Figura 3A). A atividade amilolítica presente no extrato bruto do fígado,
1132 apresentou pico de atividade a 40°C (Figura 5A), enquanto mais de 80% da atividade foi
1133 encontrada em 30 a 55°C (Figura 5A). Para a atividade enzimática da pepsina presente no
1134 extrato bruto do estômago foi maior a 50°C, com mais de 80% de sua atividade em 35 a
1135 50°C (Figura 4A).

1136 A atividade da tripsina presente no extrato bruto do intestino se manteve estável a
1137 uma temperatura de 20 a 70°C, perdendo toda atividade a 75°C (Figura 1C). A
1138 quimotripsina e a leucino-aminopeptidase presentes no extrato bruto do intestino
1139 apresentaram estabilidade térmica de 20 a 50°C (Figura 2C e 3C, respectivamente), ambas
1140 em tratamento térmico de 30 minutos.

1141 A estabilidade térmica da pepsina presente no extrato bruto do estômago apresentou
1142 atividade enzimática acima de 80% em temperatura de 25 a 45°C (Figura 4C). A atividade
1143 amilolítica presente no extrato bruto do fígado, durante tratamento térmico de 30 minutos,
1144 apresentou atividade residual acima de 80% em temperatura de 25 a 25°C (Figura 5C).

1145 O efeito do pH sobre a atividade enzimática revelou maior atividade da tripsina
1146 presente no extrato bruto do intestino, em valores de pH variando de 9-10 (Fig. 1B),
1147 enquanto a maior atividade enzimática da quimotripsina e leucino-aminopeptidase, ambas

1148 presentes no extrato bruto do intestino, foram em pH variando de 7,5 a 9,5 (Figura 2B e
 1149 3B, respectivamente). A pepsina presente no extrato bruto do estômago apresentou maior
 1150 atividade enzimática em pH 2, porém 80% de sua atividade foi em pH variando de 1,5-3,5
 1151 (Figura 4B). Atividade amilolítica presente no extrato bruto do fígado, apresentou faixa de
 1152 atividade enzimática em pH 6,5 a 8 (Figura 5B).

1153 A Figura 6 mostra atividade enzimática das aminopeptidases presentes no extrato
 1154 bruto do intestino: Ala, Arg, Leu, Ile, Pro, His, Tir, Gli, e Ser. Quando comparadas a outras
 1155 aminopeptidases avaliadas, Alanina e Leucina aminopeptidases apresentaram maior
 1156 atividade.

1157 **Tabela 1.** Atividade enzimática presente no extrato bruto de juvenis de linguado
 1158 *Paralichthys orbignyanus* utilizando diferentes substratos.

| Órgão | Substratos | | | | | |
|------------------|----------------|---------------|--------------------|----------------------|------------------|-----------------|
| | *BAPN A 8mM | *SAPNA 4mM | *Leu-p- Nan 8mM | *Azocaseí na (1%) | *Hemoglobi na | **Amido (2%) |
| Intestino | 0,51±0,2 | 2,62±1,8 | 0,97±0,83 | 3,58±2,36 | - | 0 |
| Fígado | 0 | 0 | 0 | 0,002±0,0 01 | - | 0,03±0,00 8 |
| Estômago | - | - | - | - | 0,3645±0,25 | - |

1159 BApNA – benzoil arginina ρ -nitroanilida, específico para tripsina; SApNA – N-
 1160 succinil-Ala-Ala-Pro-Phe- p -nitroanilida, específico para quimotripsina; Suc-Phe- p -Nan,
 1161 específico para quimotripsina; Leu- p -Nan – aminoacil de β – naftilamida, específico para
 1162 leucino - aminopeptidase; Azocaseína, inespecífico para peptidases alcalinas;
 1163 Hemoglobina, inespecífico para pepsina; Amido, inespecífico para amilases.

1164 *mU mg⁻¹ proteína ± DP; n= 3;

1165 **µg de maltose/mg de proteína;

1166 **Tabela 2.** Efeito dos inibidores específicos sobre atividade das peptidases presente
1167 no extrato bruto do intestino de juvenis de linguado *Paralichthys orbignyana*.

| Inibidores (8mM) | Atividade Residual (% ± DP; n=3) | | |
|--------------------|-----------------------------------|--------------------|-----------|
| | BapNa | Succ-phe-p- NAN | Leu-p-NAN |
| Controle* | 100 ± 0,7 | 100 ± 3,2 | 100 ± 5,9 |
| PMSF | 52 ± 2,3 | 42 ± 1,2 | 43 ± 1,4 |
| TLCK | 33 ± 1,8 | 45 ± 0,3 | 44 ± 4,1 |
| TPCK | 100 ± 1,2 | 79 ± 4,5 | 60 ± 1,8 |
| Benzamidina | 41 ± 2,3 | 58 ± 0,5 | 40 ± 1,2 |

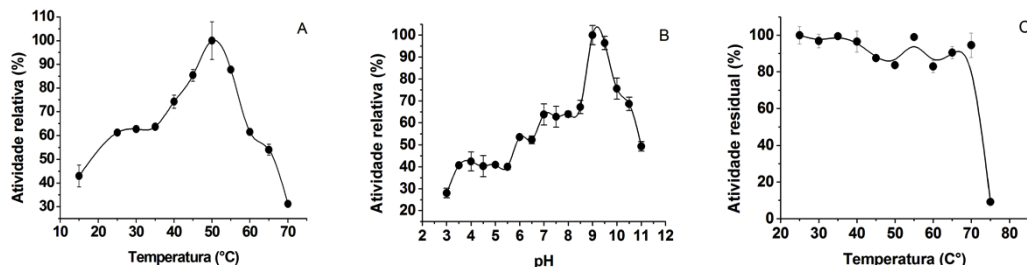
1168 *Atividade sem adição de inibidores;

1169 PMSF – fluoreto fenil-metil-sulfonil, inibidor de peptidases; TLCK – tosil cetona
1170 lisina clorometil, inibidor de tripsina; Benzamidina, inibidor de tripsina; TPCK – tosil
1171 fenilalanina clorometil cetona, inibidor de quimotripsina;

1172 **Tabela 3.** Efeito de um inibidor específico sobre atividade amilolítica presente no
1173 extrato bruto do fígado de juvenis de linguado *Paralichthys orbignyana*.

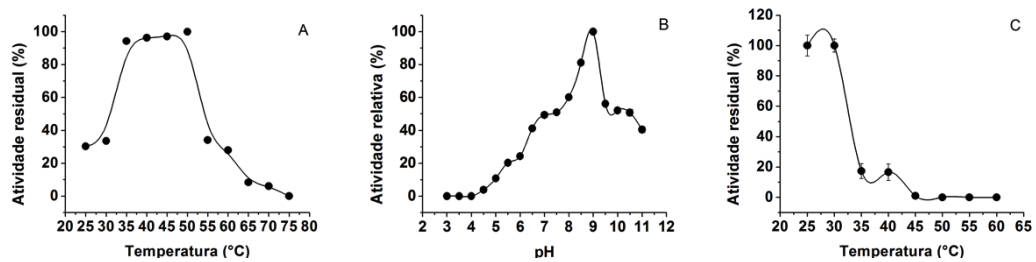
| Inibidores (µg/mL) | Atividade Residual (% ± DP; n=3) | Inibição (%) |
|-----------------------|-------------------------------------|--------------|
| Controle* | 100 ±16,1 | 0 |
| 500 | 74 ± 9,6 | 26 |

1174 *Atividade sem adição de inibidores; Inibidor I de α -amilase obtido do vegetal
 1175 *Triticum aestivum*.
 1176



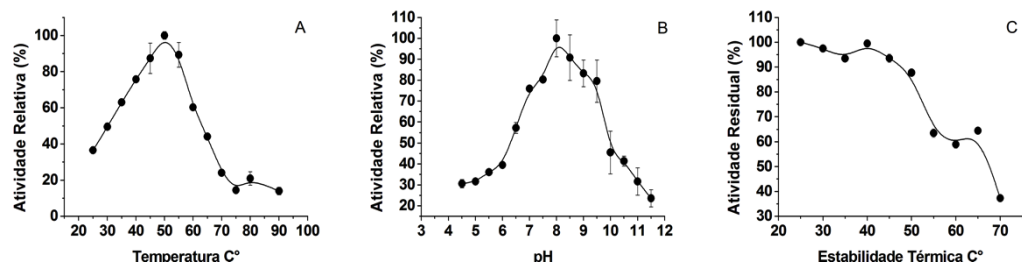
1177

1178 **Figura 1.** Efeito da temperatura (A), pH (B) e estabilidade térmica (C) na atividade
 1179 da tripsina presente no extrato bruto do intestino dos linguados (*P. orbignyanus*) utilizando
 1180 substrato BApNA. Valores são apresentados como média ± DP.



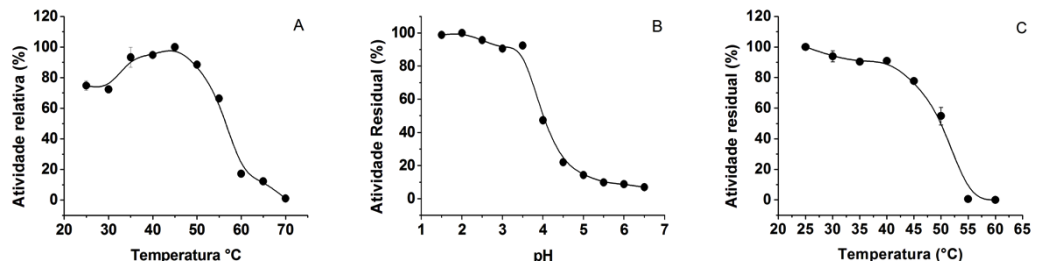
1181

1182 **Figura 2.** Efeito da temperatura (A), pH (B) e estabilidade térmica (C) na atividade
 1183 da quimotripsina presente no extrato bruto do intestino dos linguados (*P. orbignyanus*)
 1184 utilizando substratos SApNa. Valores são apresentados como média ± DP.



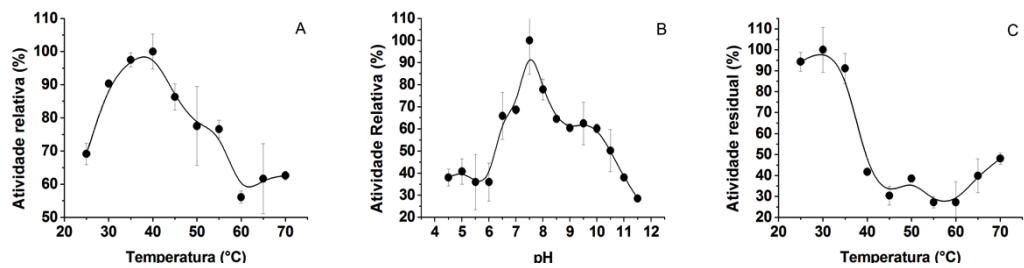
1185

1186 **Figura 3.** Efeito da temperatura (A), pH (B) e estabilidade térmica (C) na atividade
1187 da leucino-aminopeptidase presente no extrato bruto do intestino dos linguados (*P.*
1188 *orbignyana*) utilizando substrato Leu-p-Nan. Valores são apresentados como média \pm DP.



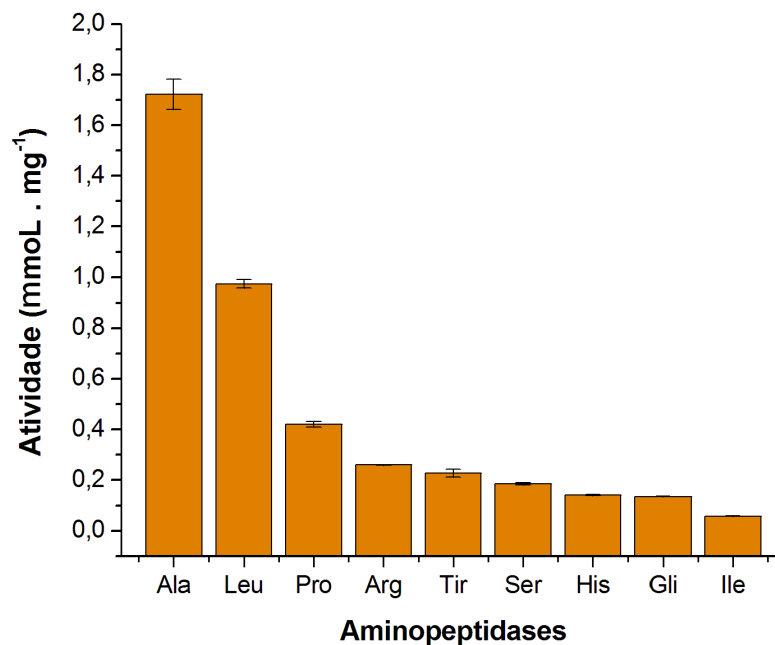
1189

1190 **Figura 4.** Efeito da temperatura (A), pH (B) e estabilidade térmica (C) na atividade
1191 proteolítica presente no extrato bruto do estômago dos linguados (*P. orbignyana*)
1192 utilizando hemoglobina como substrato. Valores são apresentados como média \pm DP.



1193

1194 **Figura 5.** Efeito da temperatura (A), pH (B) e estabilidade térmica (C) na atividade
1195 amilolítica presente no extrato bruto do fígado dos linguados (*P. orbignyana*) utilizando
1196 amido como substrato. Valores são apresentados como média \pm DP.



1197

1198

1199

1200

1201

1202

1203

1204

1205

1206

1207

1208

1209

1210

Figura 6. Atividade enzimática de aminopeptidases presentes no extrato bruto do

intestino dos linguados (*Paralichthys orbignyanus*). Valores são apresentados como média

± DP.

4. Discussão

4.1. Atividade enzimática

Estudos sobre a fisiologia digestória e atividade enzimática formam conhecimentos básicos e importantes para avaliação nutricional de peixes teleósteos em cativeiro (Ye et al. 1998; Papoutsoglou e Lyndon, 2005; Tian et al. 2007). No entanto, o enfoque principal destes estudos são padrões enzimáticos em larvas e não em juvenis e peixes adultos (Krogdahl et al., 2005; Ushakova e Kuz'mina, 2010). Segundo Lundstedt et al. (2004) o conhecimento da atividade enzimática não é suficiente para definir a dieta adequada para o peixe, porém quando associada a parâmetros metabólicos, são indicadores confiáveis do estado nutricional dos peixes.

1211 A utilização de substratos e inibidores específicos demonstram fortes evidências da
1212 existência de tripsina, quimotripsina e aminopeptidases no intestino do *P. orbignyana*. A
1213 presença de endo/exopeptidases em um mesmo compartimento é uma vantagem
1214 adaptativa, tornando a digestão de proteínas mais eficiente. Após a hidrólise de proteínas
1215 por endopeptidases, estas são degradadas em frações menores a aminoácidos livres,
1216 melhorando a absorção destes nutrientes (Buarque et al. 2009).

1217 Segundo Chiu e Pan (2002), quanto maior atividade enzimática da pepsina, maior a
1218 eficiência na utilização da proteína e maior a taxa de crescimento do peixe. Sabapathy e
1219 Teo (1993) relatam que peixes carnívoros possuem atividade enzimática da pepsina maior
1220 que peixes herbívoros, ou seja, peixes carnívoros possuem melhor potencial para digestão
1221 de proteína. A atividade da pepsina encontrada no extrato bruto do estômago dos linguados
1222 foi maior que ao encontrado para diversas espécies de peixes carnívoros: *Symphysodon*
1223 *aequifasciata* (Chong et al. 2002), *Scleropages formosus* (Natalia et al., 2004),
1224 *Glyptosternun maculatum* (Xiong et al., 2009) e *Thunnus alalunga* (Nalinanon et al.,
1225 2010). Fato que demonstra uma vantagem biológica do *P. orbignyana* na digestão
1226 proteica.

1227 A atividade amilolítica para *P. orbignyana* foi encontrada apenas no fígado, não
1228 obtendo atividade no estômago e no intestino. A atividade amilolítica tem sido relatada em
1229 outras espécies: *Cyprinus carpio*, *Carassiu aratus*, *Sparus aurata* e *Anguilla anguilla*, no
1230 fígado, intestino e bile, *Tinca tinca* no fígado e intestino, *Oncorhynchus mykiss* no intestino
1231 (Hidalgo et al., 1999); *Glyptosternun maculatum*, no intestino e estômago (Xiong et al.
1232 2009), *Paralichthys olivaceus*, nos cécos pilóricos, intestino e fígado (Deng et al., 2010).
1233 Segundo Krogdahl et al. (2005), a presença de amilases no fígado, provavelmente deve-se
1234 a infiltrações do tecido pancreático, pois a única fonte de α -amilase em peixes é de origem
1235 pancreática. Entretanto, a atividade amilolítica encontrada no fígado pode apresentar

1236 origem intracelular, cujas enzimas participam da glicogenólise (Mehrani e Storey, 1993),
1237 ou ainda as amilases podem ser produzidas pela microflora do trato digestório (Sugita et
1238 al., 1997). É importante ressaltar que a maioria dos peixes carnívoros apresenta baixa ou
1239 moderada atividade de α -amilase no intestino e pâncreas (Munilla-Morán e Saborido-Rey,
1240 1996), que está relacionado com o baixo teor de carboidratos na dieta destes peixes no
1241 ambiente natural (Harpaz e Uni, 1999).

1242 Buarque et al. (2009) encontrou significativa relação entre atividade das
1243 aminopeptidases com as concentrações recomendadas de aminoácidos essenciais em dietas
1244 de camarão. Estes autores acreditam que este resultado possa indicar uma resposta
1245 fisiológica a hidrólise de proteínas em relação as concentrações requeridas de aminoácidos
1246 essenciais. Segundo Buarque et al. (2010) a maior atividade enzimática das
1247 aminopeptidases encontrada para *Farfantepenaeus subtilis*: alanina, arginina, leucina e
1248 lisina são os mesmos necessários em grande quantidade na dieta de peneídeos. Assim, a
1249 determinação da atividade das aminopeptidases pode contribuir para o entendimento das
1250 relações entre atividade enzimática e composição da dieta, em termos de necessidade de
1251 nutriente.

1252 No linguado, houve maior hidrólise de substratos contendo alanina e leucina, porém
1253 não é possível correlacionar esta atividade com as exigências nutricionais dos aminoácidos
1254 requeridos para espécie, pois não há na literatura dados da exigência nutricional para *P.*
1255 *orbignyanus*. Segundo o NRC (2011) a alanina não está dentro dos dez aminoácidos
1256 limitantes para peixes, entretanto a leucina sim. Assim, devido à pouca informação
1257 disponível sobre aminopeptidases de peixes, foi utilizado Leu-p-Nan como substrato
1258 específico da leucina-aminopeptidase, para proporcionar uma maior compreensão destas
1259 enzimas.

1260 4.2. Efeito do pH nas peptidases e na amilase

1261 Alterações do pH podem interferir tanto no substrato como na enzima, alterando a
1262 conformação das moléculas (Klomklao et al., 2006). Quando expostas a soluções muito
1263 ácidas, ou alcalinas, sofrem desnaturação irreversível, resultando em perda de atividade
1264 (Silva et al., 2011).

1265 A atividade de tripsina, quimotripsina e leucino-aminopeptidase presentes no
1266 extrato bruto do intestino do linguado apresentaram uma faixa de pH ampla e semelhante à
1267 outras espécies de peixes. Wang et al. (2010) reportou para tripsina purificada do híbrido
1268 de tilápia do Nilo pH 7-11. Souza et al. (2007) reportou pico de atividade da tripsina em
1269 pH 9 para *Pseudupeneus maculatus*. Freitas-Júnior et al. (2012) purificou a tripsina da
1270 espécie *Araipama gigas* e encontrou pico de atividade enzimática em pH 9 sendo 80% da
1271 atividade na faixa de 8-10. As tripsinas de organismos aquáticos estão ativas e estáveis
1272 numa gama de pH 7,5-10, e são capazes de hidrolisar vários substratos (De Vecchi e
1273 Coppes, 1996). Segundo Alencar et al. (2003) a faixa de atuação de enzimas proteolíticas
1274 alcalinas vai de 7 a 9, porém Marcuschi et al. (2010) encontrou para tripsina purificada do
1275 *Colossoma Macropomum* pH 7,5 – 11,5 e pico 9,5. Esta diferença pode estar associada ao
1276 extrato bruto, em que há diversas peptidases (Alencar et al., 2003).

1277 Em geral a quimotripsina é mais ativa na faixa de pH 7,5 a 8,5, sendo mais estáveis
1278 em pH 9 (Simpson, 2000). Parra et al. (2007) encontrou pico de atividade da leucino-
1279 aminopeptidase em pH 8 para a espécie *Thunnus orientalis*, igual ao encontrado neste
1280 trabalho.

1281 A faixa de pH para atividade amilolítica do extrato bruto do fígado do linguado
1282 encontrada foi semelhante à outras espécies como para *Glyptosternum maculatum* (pH 7;
1283 Xiong et al., 2009), *Leiocassis longirostris*, *Sirulus meridionalis* (7,4; 7; Ye et al., 1998),
1284 respectivamente. O pH ótimo para amilases perto do pH neutro foi relatada tanto para
1285 peixes marinhos, como de água doce (Ugwumba, 1993; Munilla-Morán e Saborido- Rey,

1286 1996). Fernández et al. (2001) encontrou para cinco espécies de peixes da família
1287 Esparídeos, atividade em ampla faixa de pH (4-9). Segundo Krogdahl et al. (2005)
1288 características da amilase diferem entre espécies, por apresentaram mais de uma isoforma.

1289 A atividade enzimática da pepsina presente no extrato bruto do estômago do
1290 linguado apresentou ampla faixa de pH. Xiong et al. (2009) para a espécie *Glyptosternum*
1291 *maculatum* apresentou faixa de atividade ligeiramente inferior (1-3), com pico de atividade
1292 em pH 2. Chong et al. (2002) para *Symphysodon aequifasciata* também encontrou faixa de
1293 atividade enzimática para pepsina inferior ao relatado neste trabalho e pico de atividade em
1294 pH 2. A maioria das espécies de peixes contêm dois ou três grupos de pepsinas com maior
1295 atividade em pH que varia de 2 a 4 (Gildberg e Raa, 1983).

1296 4.3. Efeito da temperatura nas peptidases e amilase

1297 A tripsina esteve ativa em ampla faixa de temperatura, como também após
1298 tratamento térmico de 30 minutos. O pico da atividade enzimática foi inferior a outras
1299 espécies de peixes: *Oncorhynchus mykiss* (60°C; Kristjansson, 1991), *Colossoma*
1300 *macropomum* (60°C; Bezerra et al., 2001), híbrido de tilápia (60°C; Wang et al., 2010),
1301 *Arapaima gigas* (65°C; Freitas-Junior et al., 2012). O pico da atividade amilolítica foi
1302 superior ao encontrado por Xiong et al. (2009) para a espécie *Glyptosternun Maculatum*
1303 (30°C), porém superior a temperatura do habitat de juvenis de *P. orbignyanus* (20-26°C)
1304 (Okamoto e Sampaio, 2012).

1305 Segundo Wang et al. (2010) e Marcuschi et al. (2010) a faixa de temperatura da
1306 atividade enzimática da tripsina é semelhante tanto para espécies de clima temperado,
1307 como de clima tropical. Porém, outros autores mostraram que enzimas de peixes adaptados
1308 ao frio, têm maior atividade enzimática à baixa temperatura (Simpson e Haard, 1987;
1309 Ásgeirsson et al. 1989). Outro fato, que ainda deixa dúvidas, é o pico da atividade
1310 enzimática ocorrer a uma temperatura superior às temperaturas dos habitats destas espécies

1311 citadas. Provavelmente, durante a evolução, espécies de peixes tiveram que adaptar-se às
1312 mudanças climáticas (Freitas-Júnior et al., 2012). Como adaptações genéticas, que ocorrem
1313 ao longo de gerações, mais especificamente, modificações estruturais nas enzimas e
1314 conseqüentemente, mudanças em suas características catalíticas (Val e Almeida-Val 1995).
1315 Segundo Bezerra et al. (2000) animais ectotérmicos, como os peixes, exibem adaptações
1316 na atividade enzimática.

1317 Apesar de ter sido observada ampla faixa de estabilidade térmica para as peptidases
1318 do linguado (*P. orbignyanus*), Kishimura et al. (2008) encontraram uma correlação direta
1319 entre a temperatura do habitat dos peixes e a estabilidade térmica da tripsina. Além disso,
1320 Gudmundsdottir e Pálsdóttir (2005) sugerem que tripsinas de peixes adaptados a ambientes
1321 frios têm maior eficiência catalítica e menor estabilidade térmica devido à sua flexibilidade
1322 molecular. Portanto resultados distintos, já que esta espécie de linguado vive em águas
1323 mais frias.

1324 A leucino – aminopeptidase e a quimotripsina presentes no extrato bruto do
1325 intestino do linguado apresentaram característica semelhante à tripsina. Sabapathy e Teo
1326 (1993) mencionam que a leucino – aminopeptidase pode compensar a atividade da tripsina
1327 de robalos, digerindo oligopeptídeos em aminoácidos livres para adsorção. Após a
1328 hidrólise de polipeptídeos por endopeptidase (pepsina, tripsina e quimotripsina), a leucino
1329 – aminopeptidase degrada mais proteínas em peptídeos pequenos e aminoácidos (Munilla-
1330 Moran e Stark, 1990).

1331 A atividade da pepsina presente no extrato bruto do estômago dos linguados foi
1332 ativa durante 30 minutos a temperaturas abaixo de 45°C, com perda significativa em
1333 temperatura acima de 50°C. Resultado semelhante ao relatado por Castillo-Yáñez et al.
1334 (2004) para *Sardinops sagax caerulea*. Estes autores sugerem que esta característica é
1335 importante para aplicações tecnológicas, especialmente na extração de colágeno.

1336 Segundo Parra et al. (2007) a atividade enzimática da α -amilase para *Thunnus*
1337 *orientalis* em temperatura de 35 a 45°C, é considerada ampla, comparada à outros
1338 trabalhos (Munilla-Morán e Saborido-Rey. 1996; Hidalgo et al., 1999), porém neste estudo
1339 encontrou maior faixa de temperatura, em que atividade enzimática esteve acima de 80%
1340 do seu potencial relatado. Entretanto, quando exposta a temperaturas inferiores a 35°C,
1341 durante 30 minutos, há queda na atividade. Fernández et al. (2001) encontrou resultado
1342 semelhante para *Boops boops*, porém para *Pagrus pagrus* e *Diplodus annularis* a atividade
1343 amilolítica não apresentou redução, mesmo por período de incubação de 90 minutos, a
1344 60°C. Ainda segundo Fernández et al. (2001) esta diferença, não parece ser um mecanismo
1345 de adaptação a diferentes condições ambientais, uma vez que estas espécies são
1346 encontradas nas mesmas águas. Esta diferença pode estar relacionada com variações na
1347 estrutura primária e no número de ligações de dissulfeto da enzima.

1348 4.4. Efeito dos inibidores nas peptidases alcalinas e na amilase

1349 Os inibidores são utilizados para determinar a natureza das enzimas e compreender
1350 os mecanismos enzimáticos (Barrett, 1994). O TLCK interage covalentemente com a
1351 histidina do sítio catalítico da tripsina, bloqueando a porção do centro ativo da enzima,
1352 responsável pela ligação com o substrato (Palmer, 1995; Pavlisko et al. 1997). De forma
1353 semelhante, o TPCK, com a presença de um radical fenilalanina em sua estrutura, torna-o
1354 um poente agente acilador, que age sobre a histidina 57 da quimotripsina, inativando-a
1355 (Voet e Voet, 1996). A Benzamidina, um derivado de amidina, apresenta uma forte
1356 inibição trípica, pois é conhecido na literatura que o sítio ativo de tripsina é inibido por
1357 guanidinas e amidinas, desta forma há uma comprovação que a enzima em análise é uma
1358 tripsina (Mihalyi, 1978).

1359 Os padrões de inibição de peptidases não foram semelhantes às outras espécies de
1360 peixes, como também o grau de inibição. Kim e Jeong (2012) para o *Paralichthys*

1361 *olivaceus* encontraram inibição completa para a tripsina purificada, utilizando PMSF,
1362 TLCK e benzamidina. Klomklao et al. (2007; 2010) para *K*
1363 *atsuwonus pelamis* e *Cololabis saira*, respectivamente, também encontraram inibição
1364 completa, tanto para TLCK como para TPCK. Ainda para larvas de *Paralichthys olivaceus*
1365 a inibição foi: PMSF: 68.7%, TLCK: 60.4%, TPCK: 48.3% (Shi et al., 2006).

1366 Castillo-Yanez et al. (2006) para *Sardinops sagax caerulea* encontrou cerca de 40%
1367 de inibição de tripsina utilizando o PMSF e 80% utilizando a benzamidina. Chong et al.
1368 (2002) para *Symphysodon aequifasciata* encontrou: PMSF (59%), TLCK (46%) e TPCK
1369 (40%). A benzamidina é um inibidor de tripsina, porém inibe também outras serino
1370 peptidases, com forte inibição sobre enzimas do tipo tripsina símile. Estes padrões de
1371 inibição peculiares observados neste trabalho podem ser explicados devido a estes
1372 inibidores serem criados baseados em enzimas de mamíferos. Buarque et al. (2009)
1373 observaram que não houve inibição na atividade de quimotripsina do camarão
1374 *Farfantepenaeus subtilis* em ensaio utilizando o inibidor específico para quimotripsina de
1375 mamíferos TPCK (tosyl-phenylalanine chloromethyl ketone). Fatos como estes
1376 demonstram a importância destes estudos, em que é possível observar e comparar a
1377 diversidade molecular entre as espécies.

1378 A atividade amilolítica no extrato bruto do fígado dos linguados foi pouco inibida
1379 com o inibidor de α -amilase, obtido do vegetal *Triticum aestivum*. Este resultado pode
1380 estar associado à baixa sensibilidade do inibidor com a espécie. Fernández et al. (2001)
1381 citou que a eficácia deste inibidor parece mudar de acordo com as espécies. Ainda segundo
1382 este autor, a taxa de inibição variou de 0% a 61% em cinco espécies de esparídeos.
1383 Contudo, Castro et al. (2012) encontrou para três espécies de camarões peneídeos inibição
1384 total para *F. subtilis* e *L. schmitti* utilizando o mesmo inibidor à uma concentração de 50

1385 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, enquanto para *L. vannamei* a taxa de inibição foi de 43 e 22%, para adultos e
1386 juvenis, respectivamente.

1387 4.5. Aplicações Biotecnológicas

1388 A tripsina e a leucino-aminopeptidases presentes no extrato bruto do intestino
1389 mostraram ampla estabilidade térmica, com atividade até 70 e 50°C, respectivamente,
1390 durante 30 minutos. Resultado semelhante foi descrito por Klomklao et al. (2005);
1391 Espósito et al. (2009) e por Freitas-Jr et al. (2012). De acordo com Klomklao et al. (2005)
1392 a maioria das peptidases alcalinas de organismos aquáticos são estáveis e ativas sob
1393 condições adversas, o que torna estas enzimas um alvo interessante para diversos segmentos
1394 industriais, tais como indústria de detergentes e alimentos (Freitas-Júnior et al., 2012).

1395

1396 A utilização destas enzimas a partir de vísceras de peixe representa uma alternativa
1397 interessante quando o objetivo é minimizar o custo de produção, perdas e danos ambientais
1398 causados por este desperdício (Souza et al., 2007). Entretanto outros estudos são
1399 necessários para viabilizar esta aplicação.

1400 Estes resultados fornecem informações adicionais sobre a biologia do *P.*
1401 *orbignyanus* e pode ser usado como referência comparativa para mais estudos da fisiologia
1402 da espécie. Portanto, realizou-se um estudo primário da fisiologia digestória do *P.*
1403 *orbignyanus* e mais pesquisas serão necessárias para o conhecimento detalhado da digestão
1404 e nutrição da espécie.

1405

1406

1407

1408

1409

1410

1411 **Referências**

1412 Alam, M.S.; Watanabe, W.O., 2009: Effect of different dietary protein and lipid
1413 levels on growth performance and body composition of juvenile southern flounder,
1414 *Paralichthys lethostigma*, reared in a recirculating aquaculture system. J. World. Aquacult.
1415 **40**, 513-521.

1416 Alencar, R. B.; Biondi, M. M.; Paiva, P. M. G.; Vieira, V. L. A.; Carvalho, L. B.
1417 Jr.; Bezerra, R. S., 2003: Alkaline proteases from digestive tract of four tropical fishes.
1418 Braz. J. Food Technol. **6**, 279–284.

1419 Bernfeld, P. 1955. Amylases, α and β , pp. 149-158. In, Methods of Enzymology.
1420 Vol. 1. 1st Edition. Academic Press, New York.

1421 Bezerra, R. S.; Dos Santos, J. F.; Lino, M. A. S.; Vieira, V. L.; Carvalho Jr, L. B.,
1422 2000: Characterization of stomach and pyloric caeca proteinases of tambaqui (*Colossoma*
1423 *macropomum*). J. Food Biochem. **24**, 189-199.

1424 Bezerra, R. S.; Lins, E. L. F.; Alencar, R.B.; Paiva, P. M. G.; Chaves, M. E. C.;
1425 Coelho, L. C. B. B.; Carvalho Jr., L. B., 2005: Alkaline proteinase from intestine of Nile
1426 tilapia (*Oreochromis niloticus*). Process. Biochem. **40**, 1829–1834.

1427 Bezerra, R. S.; Santos, J. F.; Paiva, P. M. G.; Correia, M. T. S.; Coelho, L. C. B. B.;
1428 Vieira, V. L. A.; Carvalho Jr., L. B., 2001: Partial purification and characterization of a
1429 thermostable trypsin from pyloric caeca of tambaqui (*Colossoma macropomum*). J. Food
1430 Biochem. **25**, 199-210.

1431 Bradford, M. M., 1976: A rapid and sensitive method for the quantitation of
1432 microgram quantities of protein utilizing the principle of protein binding. Anal. Biochem.
1433 **72**, 248-254.

1434 Brody, T., 1994: Nutritional Biochemistry. Academic Press, printed in the USA,
1435 657p.

1436 Buarque, D. S.; Castro, P. F.; Santos, F. M. S.; Amaral, I. P. G.; Oliveira, S. M.;
1437 Alves, K. B.; Carvalho Jr., L. B.; Bezerra, R. S., 2010: Digestive proteinases and
1438 peptidases in the hepatopancreas of the Southern brown shrimp (*Farfantepenaeus subtilis*)
1439 in two sub-adult stages. *Aquacult. Nutr.* **16**, 359-369.

1440 Buarque, D. S.; Castro, P. F.; Santos, F. M. S.; Lemos, D.; Carvalho-Jr, L. B.;
1441 Bezerra, R. S., 2009: Digestive peptidases and proteinases in the midgut gland of the pink
1442 shrimp *Farfantepenaeus paulensis* (Crustacea, Decapoda, Penaeidae). *Aquacult. Res.* **40**,
1443 861-870.

1444 Castillo-Yañes, F. J.; Pacheco-Aguilar, R.; García-Carreño, F. L.; Navarrete-Del-
1445 Toro, M. A., 2004: Characterization of acidic proteolytic enzymes from Monterey sardine
1446 (*Sardinops sagax caerulea*) viscera. *Food Chem.* **85**, 343-350.

1447 Castillo-Yañez, F. J.; Pacheco-Aguilar, R.; García-Carreño, F. L.; Navarrete-Del
1448 Toro, M. A.; López, M. A., 2006: Purification and biochemical characterization of
1449 chymotrypsin from the viscera of Monterey sardine (*Sardinops sagax caeruleus*). *Food*
1450 *Chem.* **99**, 252-259.

1451 Castro, P. F.; Freitas-Jr, A. C. V.; Santana, W. M.; Costa, H. M. S.; Carvalho-Jr, L.
1452 B.; Bezerra, R. S., 2012: Comparative study of amylases from the midgut gland of three
1453 species of penaeid shrimp. *J. Crust. Biol.* **32**, 607-613.

1454 Cho, S.H.; Lim, Y. S.; Lee, J. H.; Lee, J. K.; Park, S.; Lee, S. M., 2003: Effects of
1455 feeding rate and feeding frequency on survival, growth, and body composition of Ayu
1456 post-larvae *Plecoglossus altivelis*. *J. World Aquacult. Soc.* **34**, 85-91.

1457 Chong, A. S. C.; Hashim, R.; Chow-Yang, L.; Ali, A. B., 2002: Partial
1458 characterization and activities of proteases from the digestive tract of discus fish
1459 (*Symphysodon aequifasciata*). *Aquaculture* **203**, 321–333.

1460 De Vecchi, S.; Coppes, Z., 1996: Marine fish digestive proteases - relevance to
1461 food industry and the southwest Atlantic region - a review. *J. Food Biochem.* **20**, 193-214.

1462 Deng, J.; Mai, K.; Ai, Q.; Zhang, W.; Tan, B.; Xu, W.; Liufu, Z., 2010: Alternative
1463 protein sources in diets for japonese flounder *Paralichthys olivaceus* (Temminck and
1464 Schlegel): II. Effects on nutrient digestibility and digestive enzyme activity. *Aquacult. Res.*
1465 **41**, 861-870.

1466 Espósito, T. S.; Amaral, I. P. G.; Buarque, D. S.; Oliveira, G. B.; Carvalho-Jr., L.
1467 B.; Bezerra, R. S., 2009: Fish processing waste as a source of alkaline proteases for
1468 laundry detergent. *Food Chem.* **112**, 125-130.

1469 Fernández, I.; Moyano, F.J.; Diaz, M.; Martinez, T., 2001: Characterization of
1470 alpha-amylase activity in five species of Mediterranean sparid fishes (Sparidae, Teleostei).
1471 *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* **262**, 1–12.

1472 Figueiredo, J. L.; Menezes, N. A., 2000: Manual de peixes marinhos do sudeste do
1473 Brasil (Handbook of marine fish in southeastern Brazil). Museu de zoologia, Universidade
1474 de São Paulo, São Paulo, p 116.

1475 Freitas-Júnior, A. C. V.; Costa, H. M. S.; Icimoto, M. Y.; Hirata, I. Y.; Marcondes,
1476 M.; Carvalho Jr, L. B.; Oliveira, V.; Bezerra, R. S., 2012: Giant Amazonian fish pirarucu
1477 (*Arapaima gigas*): Its viscera as a source of thermostable trypsin. *Food Chem.* **133**, 1596-
1478 1602.

1479 Gatlin, D. M., 2010: Principles of fish nutrition. Southern Regional Aquaculture
1480 Center. **5003**, 1-8.

1481 Gildberg, A.; Raa, J., 1983: Purification and characterization of pepsins from the
1482 Arctic fish capelin (*Mallotus villosus*). *Comp. Biochem. Physiol.* **75A**, 337-342.

1483 Gonzalez, T.; Robert-Badouy, J., 1996: Bacterial aminopeptidases: Properties and
1484 functions. *FEMS Microbiol. Rev.* **18**, 319-344.

1485 Gudmundsdóttir, Á., Pálsdóttir, H.M., 2005. Atlantic cod trypsins: from basic
1486 research to practical applications. *Mar. Biotechnol* **7**, 77–88.

1487 Harpaz, S.; Uni, Z., 1999: Activity of intestinal mucosal brush border membrane
1488 enzymes in relation to the feeding habits of three aquaculture fish species. *Comp.*
1489 *Biochem. Physiol.* **124A**, 155–160.

1490 Hidalgo, M. C.; Urea, E.; Sanz, A., 1999: Comparative study of digestive enzymes
1491 in fish with different nutritional habits. Proteolytic and amylase activities. *Aquaculture*
1492 **170**, 267-283.

1493 Khaled, H. B.; Ghorbel-Belaaj, O.; Hmidet, N.; Jellouli, K.; Ali, N. E-L.; Ghorbel,
1494 S.; Nasri, M., 2011: A novel aspartic protease from the viscera of Sardinelle (*Sardinella*
1495 *aurita*): Purification and characterization. *Food Chem.* **128**, 847-853.

1496 Kim, M.; Jeong, Y., 2012: Purification and characterization of a trypsin-like
1497 protease from flatfish (*Paralichthys olivaceus*) intestine. *J. Food Biochem.* 1-10.

1498 Kishimura, H.; Klomklao, S.; Benjakul, S.; Chun, B., 2008: Characteristics of
1499 trypsin from the pyloric ceca of walleye pollock (*Theragra chalcogramma*). *Food Chem.*
1500 **106**, 194–199.

1501 Klomklao, S.; Benjakul, S.; Visessanguan, W.; Kishimura, H.; Simpson, B. K.,
1502 2007: Purification and characterization of trypsins from the spleen of skipjack tuna
1503 (*Katsuwonus pelanis*). *Food Chem.* **100**, 1580-1589.

1504 Klomklao, S.; Benjakul, S.; Visessanguan, W.; Kishimura, H.; Simpsom, B. K.;
1505 Saeki, H., 2006: Trypsins from yellowfin tuna (*Thunnus albacores*) spleen: Purification
1506 and characterization. *Comp. Biochem. Physiol.* **144B**, 47–56.

1507 Klomklao, S.; Benjakul, S.; Visessanguan, W.; Simpson, B. K.; Kishimura, H.,
1508 2005: Partitioning and recovery of proteinase from tuna spleen by aqueous two-phase
1509 systems. *Process Biochem.* **40**, 3061-3067.

1510 Klomklao, S.; Kishimura, H.; Benjakul, S.; Simpson, B. K.; Visessanguan, W.,
1511 2010: Cationic trypsin: A predominant proteinase in Pacific saury (*Cololabis saira*) pyloric
1512 ceca. *J. Food Biochem.* **34**, 1105–1123.

1513 Kolkovski, S., 2001: Digestive enzymes in fish larvae and juveniles – implications
1514 and applications to formulated diets. *Aquaculture* **200**, 181-201.

1515 Krogdahl, A.; Hemre, G. I.; Mommsen, T.P., 2005: Carbohydrates in fish nutrition:
1516 digestion and absorption in postlarval stages. *Aquacult. Nutr.* **11**, 103-122.

1517 López-López, S.; Nolasco, H.; Villarreal-Colmenares, H.; Civera-Cerecedo H.,
1518 2005: Digestive enzyme response to supplemental ingredients in practical diets for juvenile
1519 freshwater crayfish *Cherax quadricarinatus*. *Aquacult. Nutr.* **11**, 79-85.

1520 Marcuschi, M.; Espósito, T. S.; Machado, M. F. M.; Hirata, I. Y.; Machado, M. F.
1521 M.; Silva, M. V.; Carvalho Jr., L. B.; Oliveira, V.; Bezerra, R. S., 2010: Purification,
1522 characterization and substrate specificity of a trypsin from the Amazonian fish tambaqui
1523 (*Colossoma macropomum*). *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **396**, 667-673.

1524 Mehrani, H.; Storey, K. B., 1993: Characterization of α -glucosidases from rainbow
1525 trout liver. *Arch. Biochem. Biophys.* **306**, 188–194.

1526 Mihalyi, E., 1978: Application of proteolytic enzymes to protein structure studies.
1527 CRC Press, Boca Raton, Florida, U.S.A.

1528 Ministério da Pesca e Aquicultura, 2010: Boletim estatístico da pesca e aquicultura.
1529 p.34.

1530 Munilla-Morán, R.; Saborido-Rey, F., 1996: Digestive enzymes in marine species.
1531 I. Proteinase activities in gut from redfish (*Sebastes mentella*), seabream (*Sparus aurata*)
1532 and turbot (*Scophthalmus maximus*). Comp. Biochem. Physiol. **113B**, 395-402.

1533 Munilla-Morán, R.; Stark, J. R., 1990: Metabolism in marine flatfish VI. Effect of
1534 nutritional state of digestion in turbot, *Scophthalmus maximus* (L.). Comp. Biochem.
1535 Physiol. **95B**, 625–634.

1536 Natalia, Y.; Hashim, R.; Ali, A.; Chong, A., 2004: Characterization of digestive
1537 enzymes in a carnivorous ornamental fish, the Asian bony tongue *Scleropages formosus*
1538 (Osteoglossidae). Aquaculture **233**, 305-320.

1539 National Research Council. 2011. Nutrient Requirements of Fish. National
1540 Academy Press, Washington DC.

1541 Okamoto, M. H.; Sampaio, L. A., 2012: Sobrevivência e crescimento de juvenis do
1542 linguado *Paralichthys orbignyanus* criados em diferentes temperaturas. Atlântica **34**, 57-
1543 61.

1544 Oliveira, S. M.; Freitas-Jr., J. O.; Alves, K. B., 1999: Rabbit kidney
1545 aminopeptidases: purification and some properties. Immunopharmacol. **45**, 215-221.

1546 Palmer, T., 1995: The investigation of active site structure. Understanding Enzymes
1547 4th Ed., (T. Palmer, ed.), Horwood, London, p.176-179.

1548 Papoutsoglou, E. S.; Lyndon, A. R., 2005: Effect of incubation temperature on
1549 carbohydrate digestion in important teleosts for aquaculture. Aquacult. Res. **36**, 1252-
1550 1264.

1551 Parra, de La. A. M.; Rosas, A.; Lazo, J. P.; Viana, M. T., 2007: Partial
1552 characterization of the digestive enzymes of Pacific bluefin tuna *Thunnus orientalis* under
1553 culture conditions. *Fish Physiol. Biochem.* **33**, 223-231.

1554 Pavlisko, A.; Rial, A.; De Vecchi, S.; Coppes, Z., 1997: Properties of pepsin and
1555 trypsin isolated from the digestive tract of *Parona signata* "Palometa." *J. Food Biochem.*
1556 **21**, 289-308.

1557 Ren, M.; Ai, Q.; Mai, K.; Ma, H.; Wang, X., 2011: Effect of dietary carbohydrate
1558 level on growth performance, body composition, apparent digestibility coefficient and
1559 digestive enzyme activities of juvenile cobia, *Rachycentron canadum* L. *Aquacult. Res.* **42**,
1560 1467-1475.

1561 Sabapathy, U.; Teo, L. H., 1993: A quantitative study of some digestive enzymes in
1562 the rabbitfish, *Siganus canaliculatus* and the sea bass, *Lates calcarifer*. *J. Fish Biol.* **42**,
1563 595-602.

1564 Sampaio, L. A.; Bianchini, A.; Cerqueira, V. R., 2001: Growth of juveniles
1565 Brazilian flounder, *Paralichthys orbignyanus* cultured in different salinities, *J. Appl.*
1566 *Aquacult.* **11**, 67-75.

1567 Sampaio, L. A.; Robaldo, R. R.; Bianchini, A., 2008: Hormone-induced ovulation,
1568 natural spawning and larviculture of Brazilian flounder *Paralichthys orbignyanus*
1569 (Valenciennes, 1839). *Aquacult. Res.* **39**, 712-717.

1570 Sánchez-Paz, A.; García-Carreño, F. L.; Muhlia-Almazán A.; Hernández-Saavedra
1571 N. Y.; Yepiz-Plascencia, G., 2003: Differential expression of trypsin mRNA in the white
1572 shrimp (*Penaeus vannamei*) midgut gland under starvation conditions. *J. Exp. Mar. Biol.*
1573 *Ecol.* **292**, 1-17.

1574 Seixas Filho, J. T., 2003: Revisão sobre as enzimas digestivas nos peixes teleostei e
1575 seus métodos de determinação. *Augustus* **8**, 30-45.

1576 Shi, Z-P.; Fan, T-J.; Cong, R-S.; Wang, X-F.; Sun, Sun, W-J.; Yang, L-L., 2006:
1577 Purification and characterization of hatching enzyme from flounder *Paralichthys*
1578 *olivaceus*. Fish Physiol. Biochem. **32**, 35-42.

1579 Silva, J. F.; Espósito, T. S.; Marcuschi, M.; Ribeiro, K.; Cavalli, R. O.; Oliveira, V.;
1580 Bezerra, R. S., 2011: Purification and partial characterisation of a trypsin from the
1581 processing waste of the silver mojarra (*Diapterus rhombeus*). Food Chem. **129**, 777-782.

1582 Simpson, B.K.; Haard, N.F., 1987: Trypsin and trypsin-like enzymes from the
1583 stomach less cunner (*Tautogolabrus adspersus*): catalytic and other physical
1584 characteristics. J. Agric. Food. Chem. **35**, 652-656.

1585 Simpson, BK, 2000: Digestive Proteases from Marine Animals. In: Seafood
1586 Enzymes. Eds: Marcel Dekker, New York, NY, p 191– 213.

1587 Souza, A. A. G.; Amaral, I. P. G.; Espírito Santo, A. R.; Carvalho Jr., L. B.;
1588 Bezerra, R. A., 2007: Trypsin-like enzyme from intestine and pyloric caeca of spotted
1589 goatfish (*Pseudupeneus maculatus*). Food Chem. **100**, 1429-1434.

1590 Sugita, H.; Kawasaki, J.; Deguchi, Y., 1997: Production of amylase by the
1591 intestinal microflora in cultured freshwater fish. Lett. Appl. Microbiol. **24**, 105–108.

1592 Tian, H. J.; Zhuang, P.; Zhang, L. Z.; Hou, J. L.; Gao, L. J., 2007: Effects of water
1593 temperature on activities of digestive enzymes of juvenile *Acipenser schrenckii*. J. Fish.
1594 Sci. China **14**, 126–131.

1595 Ugwumba, A. A. A., 1993: Carbohydrases in the digestive tract of the African
1596 bony-tongue *Heterosis niloticus* (Pisces: Osteoglossidae). Hydrobiology **257**, 95–100.

1597 Ushakova, N. V.; Kuz'mina, V. V., 2010: Activity of proteinases in fish of
1598 diferente ecological groups and their potential food items. J. Ichthyol. **50**, 489-494.

1599 Val, A. L.; Almeida-Val, V. M. F., 1995: Fishes of the Amazon and their
1600 environment. Physiological and Biochemical Aspects. Springer-Verlag, pp. 70-180.

1601 Voet, D.; Voet, J. G., 1996: Biochemistry. John Wiley & Sons, printed in the USA.
1602 2a ed. p.1223.

1603 Wang, Q.; Gao, Z. X.; Zhang, N.; Shi, Y.; Xie, X. L.; Chen, Q. X., 2010:
1604 Purification and characterization of trypsin from the intestine of hybrid tilapia
1605 (*Oreochromis niloticus* x *O.aureus*). J. Agric. Food Chem. **58**, 655-659.

1606 Xiong, D. M.; Xie, C. X.; Zhang, H. J.; Liu, H. P., 2009: Digestive enzymes along
1607 digestive tract of a carnivorous fish *Glyptosternum maculatum* (Sisoridae, Siluriformes).
1608 J. Anim. Physiol. Anim. Nutr. **95**, 56-64.

1609 Ye, Y. T.; Lin, S. M.; Luo, L.; Yang, S. H.; Chen, W., 1998: The effect of
1610 temperature and pH value on activities of proteases and amylases from *Silurus*
1611 *meridionalis* and *Leiocassis longirostris*. J. Dalian Fish. Univ. **13**, 17–23.