



UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA

CENTRO DE CIÊNCIAS EXATAS E DA NATUREZA

CURSO DE BACHARELADO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

THALIA ANDRADE SILVA

ESTÔMAGO DOS PEIXES TAMBAQUI (*Colossoma macropomum*) E XARÉU (*Caranx hippos*): UMA FONTE DE PROTEASES ÁCIDAS INDUSTRIAIS

JOÃO PESSOA

2019

THALIA ANDRADE SILVA

ESTÔMAGO DOS PEIXES TAMBAQUI (*Colossoma macropomum*) E XARÉU (*Caranx hippos*): UMA FONTE DE PROTEASES ÁCIDAS INDUSTRIAIS

Trabalho acadêmico de conclusão de curso apresentado ao Curso de Ciências Biológicas como requisito parcial à obtenção do grau de Bacharel em Ciências Biológicas.

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

Coorientadora: Prof^a. Dr^a. Helane Maria Silva da Costa

JOÃO PESSOA

2019

S586e Silva, Thalia Andrade.

Estômago dos peixes tambaqui (*Colossoma macropomum*) e xaréu (*Caranx hippos*) : uma fonte de proteases ácidas industriais / Thalia Andrade Silva. - João Pessoa, 2019.

49 f. : il.

Orientação: Augusto César Vasconcelos de Freitas Júnior.

Coorientação: Helane Maria Silva da Costa.
Monografia (Graduação) - UFPB/CCEN.

1. Aproveitamento de resíduos. 2. Enzimas industriais.
3. Peixes tropicais. 4. Proteases digestórias. I.
Freitas Júnior, Augusto César Vasconcelos de. II.
Costa, Helane Maria Silva da. III. Título.

UFPB/CCEN

THALIA ANDRADE SILVA

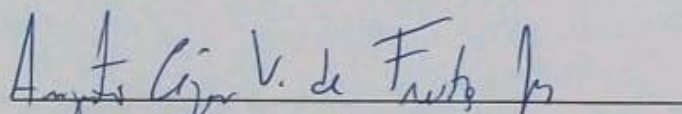
ESTÔMAGO DOS PEIXES TAMBAQUI (*Colossoma macropomum*) E XARÉU (*Caranx hippos*): UMA FONTE DE PROTEASES ÁCIDAS INDUSTRIAIS

Trabalho acadêmico de conclusão de curso apresentado ao Curso de Ciências Biológicas como requisito parcial à obtenção do grau de Bacharel em Ciências Biológicas.

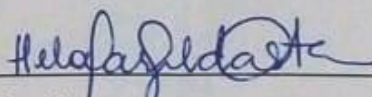
RESULTADO: APROVADA NOTA: 9,8

João Pessoa, 25 de SETEMBRO de 2019.

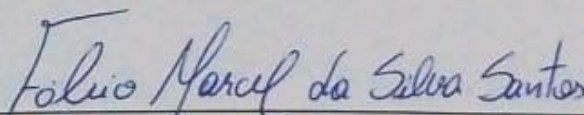
BANCA EXAMINADORA



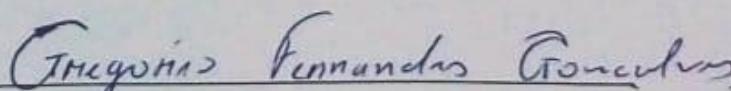
Prof. Dr. Augusto Cezar Vasconcelos de Freitas Júnior (Orientador)
DBM/CCEN/UFPB



Prof.^a. Dr.^a. Helane Maria Silva da Costa (Coorientadora)
PPGBCM/CCEN/UFPB



Prof. Dr. Fábio Marcel da Silva Santos (Examinador)
DFP/CCS/UFPB



Prof. Dr. Gregório Fernandes Gonçalves (Examinador)
DBM/CCEN/UFPB

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, Bento José da Silva Antunes e Luiza Lucinilda de Andrade Silva, que são tudo para mim, pelo amor incondicional e por todo o suporte e incentivo à carreira que escolhi seguir.

À minha irmã Suelen de Andrade Silva por ser meu alicerce durante toda a minha vida, especialmente quando eu estive completamente perdida no início da graduação, por apoiar minhas decisões e por sempre cuidar de mim.

Aos amigos de curso que fizeram meus dias mais leves em meio a toda turbulência e correria da graduação.

Ao meu orientador Prof. Dr. Augusto César Vasconcelos de Freitas Júnior por ter me aceitado como sua orientanda e ter tido tanta paciência durante esses anos. Agradeço por todos os ensinamentos, pelo apoio e pela confiança em meu trabalho.

À minha coorientadora Prof^a Dr^a Helane Maria Silva da Costa pela troca de conhecimentos e por transmitir tanto amor naquilo que faz. Você serve de inspiração para outras mulheres que tanto almejam o caminho da ciência e pesquisa.

A todos aqueles que compõem o BiOAQUA, em especial a Mariany que sempre auxiliou em minha pesquisa e se tornou uma grande amiga.

Aos meus amigos de longa data que sempre se fazem presentes e me dão força nos momentos mais difíceis, em particular Adrielle, Carol e Gustavo, pelo apoio e pelo carinho incondicional. Sou muito grata por ter vocês como minha segunda família.

Aos professores do curso responsáveis pela minha formação e por meu crescimento intelectual.

Ao Prof. Dr. Davi Felipe Farias, por disponibilizar a infraestrutura do LABRISCO para o desenvolvimento deste trabalho.

Ao Sr. Francisco de Assis, pescador e proprietário da peixaria Shalom, e à UFRN, na pessoa da Prof^a Karina Ribeiro, pela doação dos resíduos do processamento de peixes.

A PROPESQ/UFPB e CNPq pelo financiamento deste trabalho.

RESUMO

O pescado é um dos principais alimentos da população mundial, sendo assim, sua produção praticamente triplicou nas últimas décadas. O processamento dos peixes gera grande quantidade de resíduos que, geralmente, são descartados *in natura* em aterros contribuindo com o aumento da poluição ambiental. Estudos demonstram que esses resíduos são fontes importantes de moléculas bioativas de interesse industrial. Entre elas estão as pepsinas, uma protease aspártica comumente encontrada no estômago de vertebrados, incluindo os peixes. Dentre as espécies de peixes marinhos mais capturados no litoral nordestino está o xaréu (*Caranx hippos*), membro da família Carangidae. O tambaqui (*Colossoma macropomum*) é um peixe amazônico representante da família Characidae, sendo o segundo peixe mais produzido pela aquicultura brasileira. O objetivo deste trabalho foi avaliar se o estômago destas espécies de peixes é uma fonte de proteases ácidas com potencial para aplicação industrial e biotecnológica. Para isto, os extratos brutos (EB) dos estômagos do tambaqui e do xaréu foram preparados separadamente, e sua atividade proteolítica ácida (APA) determinada utilizando hemoglobina 2% (m/v) como substrato. A caracterização físico-química, o zimograma e o efeito de íons metálicos e inibidores sobre a atividade das proteases ácidas presentes nos EBs foram avaliados. A atividade proteolítica específica do EB do xaréu foi $1.404,6 \pm 3,09$ U/mg, e do tambaqui correspondeu a $774,04 \pm 6,5$ U/mg sendo a atividade máxima na temperatura de 50°C. A APA de ambas as espécies mantiveram-se estáveis até a temperatura de 40°C durante 30 min. A APA se manteve estável na faixa de pH entre 1,5 e 7,0 e foi completamente inibida pela Pepstatina A. O pH ótimo encontrado para o EB do xaréu e tambaqui foram 1,5 e 2,5, respectivamente. Nas concentrações testadas, os íons Al^{3+} , Cd^{2+} , Cu^{2+} , Mn^{2+} e Ca^{2+} promoveram uma discreta ativação, enquanto que Hg^{2+} e Pb^{2+} promoveram pequena inibição na atividade enzimática do xaréu. No tambaqui, os íons Al^{3+} , Cd^{2+} , Cu^{2+} , Mg^{2+} e Mn^{2+} promoveram inibição, enquanto que o Ca^{2+} promoveu aumento na atividade enzimática do EB. Através da zimografia pode-se evidenciar a existência de duas e três bandas proteolíticas nos estômagos dos peixes *C. hippos* e *C. macropomum* respectivamente. Pode-se sugerir que o estômago do tambaqui e do xaréu são fontes de proteases aspárticas do tipo pepsina símile, com alta atividade proteolítica e características que indicam um potencial para utilização industrial e biotecnológica. Estudos posteriores acerca da purificação e aplicação destas proteases devem ser realizados para confirmar este potencial.

Palavras-Chave: Aproveitamento de resíduos. Enzimas industriais. Peixes tropicais. Proteases digestórias.

ABSTRACT

Fishes is one of the main world population foodstuffs, so its production has tripled in recent decades. The fish processing produce a large amount of wastes that are normally discarded *in natura* on the environment, contributing to pollution increasing. Many studies have shown the importance of fish processing residues as a source of bioactive molecules for industrial and biotechnological applications. Pepsins, enzymes present in vertebrate stomachs, including fishes, are among these biomolecules. Crevalle jack (*Caranx hippos*) is a important marine fish species, which belongs to the family Carangidae, widely captured in the Brazilian Northeast Coast. Cachama (*Colossoma macropomum*) is an Amazonian fish belonging to the Characidae family, and is the second most produced fish by Brazilian aquaculture. The aim of this work was to evaluate if the stomachs of these fish species is a acid proteases source for industrial and biotechnological application. To this, a crude extract (CE) of Cachama and Crevalle jack stomachs were prepared separately and its acid proteolytic activity (APA) determined using 2% (w/v) hemoglobin as substrate. The physico-chemical characterization, zymogram, the effect of metal ions and inhibitors of the acid proteases present in CE were evaluated. The CE of Crevalle jack had a specific APA of $1.404,6 \pm 3,09$ U/mg, while the Cachama corresponded to $774,04 \pm 6,5$ U/mg and its maximum activity was observed at a temperature of 50°C. The APA of both species remained stable up to 40°C. The APA was stable in the pH range between 1.5 and 7.0; and completely inhibited by Pepstatin A. The optimum pH to Crevalle jack and Cachama CE was pH 1.5 and pH 2.5, respectively. At the concentrations tested, Al^{3+} , Cd^{2+} , Cu^{2+} , Mn^{2+} e Ca^{2+} promoted a low activation, while Hg^{2+} and Pb^{2+} promoted a low inhibition on the enzymatic activity of Crevalle jack CE. On the other hand, the ions Al^{3+} , Cd^{2+} , Cu^{2+} , Mg^{2+} and Mn^{2+} promoted higher inhibition in tambaqui CE, while Ca^{2+} promoted an considerable increase of enzymatic activity. The zymograms showed the presence of two and three proteolytic bands in stomachs of Crevalle jack and Cachama, respectively. Thus, this results demonstrate that Cachama and Crevalle jack stomachs is a source of pepsin-like proteases with, high proteolytic activity, physical-chemical characteristics that suggest a potential for industrial and biotechnological applications. Further studies on purification and application of these enzymes should be performed to confirm this potential.

Keywords: Digestive proteases. Industrial enzymes. Tropical fishes. Waste utilization.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Produção mundial da captura e aquicultura no período de 1950 a 2015	16
Figura 2 – Árvore filogenética de Craniata, clado que inclui Agnatha, Gnathostomata e Tetrapoda	18
Figura 3 – Representação geral do sistema digestório dos peixes	19
Figura 4 – Desenho esquemático comparativo do sistema digestivo de um peixe herbívoro e um peixe carnívoro	20
Figura 5 – Distribuição de <i>Colossoma macropomum</i>	21
Figura 6 – Tambaqui (<i>Colossoma macropomum</i>)	22
Figura 7 – Distribuição de <i>Caranx hippos</i>	23
Figura 8 – xaréu (<i>Caranx hippos</i>)	24
Figura 9 – Rejeitos de pescado descartados em rio	25
Figura 10 – Fluxograma dos resíduos de processamento do pescado e suas possíveis aplicações tecnológicas	26
Figura 11 – Reação de catálise enzimática	27
Figura 12 – Formação e degradação de uma ligação peptídica por hidrolases	29
Figura 13 – Estrutura terciária da pepsina do peixe <i>Gadus morhua</i>	30
Figura 14 – Efeito da temperatura sobre as proteases ácidas de <i>C. macropomum</i>	35
Figura 15 – Efeito da temperatura sobre as proteases ácidas de <i>C. hippos</i>	37
Figura 16 – Efeito do pH sobre as proteases ácidas de <i>C. macropomum</i>	38
Figura 17 – Efeito do pH sobre as proteases ácidas de <i>C. hippos</i>	39
Figura 18 – Zimograma do EB do estômago de <i>C. macropomum</i>	43

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Classificação Taxonômica do Tambaqui (<i>C. macropomum</i>)	21
Tabela 2 – Classificação Taxonômica do Xaréu (<i>C. hippos</i>)	23
Tabela 3 – Classificação internacional das enzimas	28
Tabela 4 – Efeito de inibidores e íons metálicos sobre a atividade das proteases ácidas do estômago de <i>C. macropomum</i>	41
Tabela 5 – Efeito de inibidores e íons metálicos sobre a atividade das proteases ácidas do estômago de <i>C. hippos</i>	41

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

Al^{3+} – Alumínio

ATP – Adenosina trifosfato

BSA – Albumina de Soro Bovino

Ca^{2+} – Cálcio

Cd^{2+} – Cádmió

Cu^{2+} – Cobre

DNA – Ácido desoxirribonucleico

DTT – Ditionitrosol

EB – Extrato Bruto

FAD – Dinucleótido de flavina e adenina

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

Fe^{2+} – Ferro

g – Gramas

HCl – Ácido Clorídrico

Hg^{2+} – Mercúrio

IBGE – Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística

ICMBio – Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade

IPEA – Instituto de Pesquisa Econômica Aplicada

Kg – Quilogramas

M – Molar

mA – Miliampere

mg – Miligrama

Mg²⁺ – Magnésio

mL – Mililitros

Mm – Milimolar

Mn²⁺ – Manganês

MPA – Ministério da Pesca e Aquicultura

NaCl – Cloreto de Sódio

NAD – Dinucleótido de nicotinamida e adenina

nm – Nanômetros

Pb²⁺ – Chumbo

pH - potencial Hidrogeniônico

RNA – Ácido ribonucleico

rpm – Rotações Por Minuto

SDS-PAGE – Sodium Dodecyl Sulfate-PolyAcrylamide Gel Electrophoresis

sp. – Espécie

spp. – Espécies

t – Toneladas

U – Unidades

LISTA DE SÍMBOLOS

% – Porcentagem

°C – Graus Celsius

® – Marca registrada

μL – Microlitros

μg – Microgramas

SUMÁRIO

RESUMO

ABSTRACT

1. INTRODUÇÃO	15
1.1. Aquicultura e Panorama da Pesca	15
1.2. Peixes	17
1.2.1. Tambaqui (<i>Colossoma macropomum</i>)	20
1.2.2. Xaréu (<i>Caranx hippos</i>)	23
1.3. Processamento de Resíduos Sólidos	25
1.4. Enzimas	27
1.4.1. Proteases	29
1.4.2. Proteases Ácidas	31
2. OBJETIVOS	33
2.1. Objetivo Geral	33
2.2. Objetivos Específicos	33
3. MATERIAIS E MÉTODOS	34
3.1. Coleta das Amostras e Preparação do Extrato Bruto (EB)	34
3.2. Ensaio de Atividade Enzimática e Determinação de Proteínas Totais	34
3.3. Caracterização Físico-química das Proteases Ácidas	34
3.4. Efeito de Íons Metálicos e Inibidores Específicos	35
3.5. Zimografia	35
3.6. Análises Estatísticas	35
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	36

4.1. Atividade proteolítica ácida e efeito da temperatura na atividade e estabilidade proteases ácidas	36
4.2. Efeito do pH na atividade e estabilidade das proteases ácidas	39
4.3. Efeito de inibidores específicos enzimáticos e íons metálicos na atividade das proteases ácidas	41
4.4. Zimograma	43
5. CONCLUSÕES	45
REFERÊNCIAS	46

1. INTRODUÇÃO

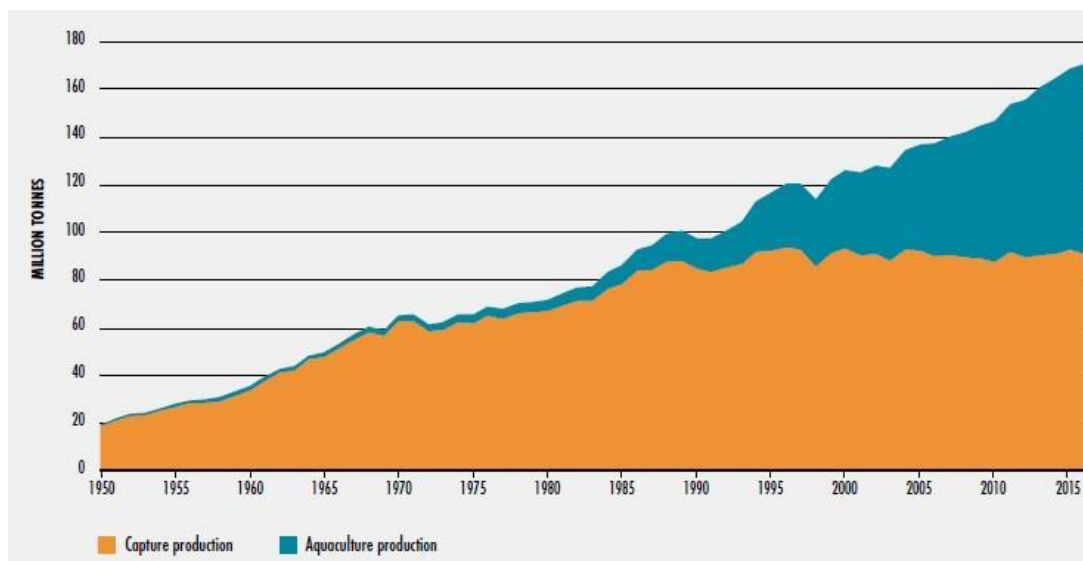
1.1. Aquicultura e Panorama da Pesca

Aquicultura, segundo o Art. 2º da Lei nº 11.959, de 29 de junho de 2009 (BRASIL, 2009), é a atividade de cultivo de organismos cujo ciclo de vida em condições naturais se dá total ou parcialmente em meio aquático, implicando a propriedade do estoque sob cultivo, equiparada à atividade agropecuária. Em síntese, aquicultura é o cultivo de organismos aquáticos de interesse humano (peixes, crustáceos, moluscos, répteis, anfíbios e plantas) em um ambiente aquático confinado e controlado. As principais modalidades da aquicultura são a piscicultura (criação de peixes) e a carcinicultura (criação de camarões) e os sistemas de cultivo mais utilizados são em viveiros escavados e em tanques-rede (IPEA, 2017).

Pode-se dizer que o Brasil é um país privilegiado quando se trata de disponibilidade hídrica. Possuindo cerca de 8.500 km de costa marítima e 5,5 milhões de hectares em reservatório de água doce, o país comporta 12% de toda a água doce disponível no planeta (CREPALDI et al., 2006). Além disso, com o clima favorável e a crescente demanda no mercado interno, o Brasil possui grandes chances de se tornar uma superpotência na aquicultura. No ano de 2016, a aquicultura brasileira atingiu um valor de produção maior que R\$ 4 bilhões, sendo aproximadamente 70% advinda da piscicultura (IBGE, 2016). Comparado com o ano anterior, a piscicultura aumentou a produção de peixes em 4,4% em todo o Brasil, cuja produção foi acima de 500 mil toneladas.

A produção mundial de pescado atingiu cerca de 171 milhões de toneladas em 2016, sendo 47% (110 milhões de toneladas) proveniente da aquicultura, a qual tem sido encarregada pelo contínuo crescimento no fornecimento de peixe para o consumo humano (FAO, 2018). Desta forma, a produção de peixes de água doce praticamente triplicou enquanto que a pesca extrativa se mantém estável desde 1985 (Fig. 1). Estima-se que até o ano de 2030 a aquicultura represente 60% do pescado para a alimentação de toda população. Assim, é notório que o consumo de peixes vem aumentando gradativamente, provavelmente pelas mudanças no hábito alimentar da população, a qual busca uma alimentação com perfil nutritivo adequado, já que a carne do pescado é rica em nutrientes e possui baixo valor de gorduras (CREPALDI et al., 2006).

Figura 1 – Produção mundial da captura e aquicultura no período de 1950 a 2015



Fonte: FAO (2018).

Apesar do crescimento da aquicultura de água doce, a produção por captura no Brasil ainda é superior. As capturas marinhas mundiais totais representaram cerca de 80 milhões de toneladas em 2016 (FAO, 2018). No Brasil, a produção de pescado total, incluindo a pesca extrativa e a aquicultura, alcançou 1.431.974,4 t, enquanto que a produção a partir da pesca extrativista sozinha atingiu 803.270 t, representando 56% da produção total. Quanto à produção pesqueira marinha por espécie no Brasil, os peixes detiveram a maior taxa de captura, correspondendo a 87% da produção total (482.335,7 t) seguido dos crustáceos com 10% e os moluscos com 3% (MPA, 2011).

Neste cenário, a região Nordeste desempenha um papel importante na produção de pescado, visto que obteve a maior produção nacional com 454.216,9 t, assim como também deteve a maior produção de pesca extrativista com 248.531,9 t (MPA, 2011). A região Nordeste possui condições favoráveis para a pesca devido a grande extensão de seu litoral com aproximadamente 3.000 km, além disso, a região possui grande potencial de produção aquícola em tanques escavados utilizando água de poço reservatórios (VIDAL, 2016). Porém, em 2015 houve uma queda de 7% na produção de pescado na região Nordeste (IBGE, 2016) que pode ser explicado devido à prolongada estiagem desde 2012, que provocou uma crise hídrica em alguns estados inviabilizando a produção de peixes através da aquicultura.

Além da obtenção de suprimento imediato de proteína para a população, a pesca representa fonte de renda para muitas famílias, enquanto a aquicultura é uma atividade de baixo custo e gera oferta de mercado mais constante, podendo ser uma alternativa de renda principalmente em regiões menos desenvolvidas (SIQUEIRA, 2017). Além da importância

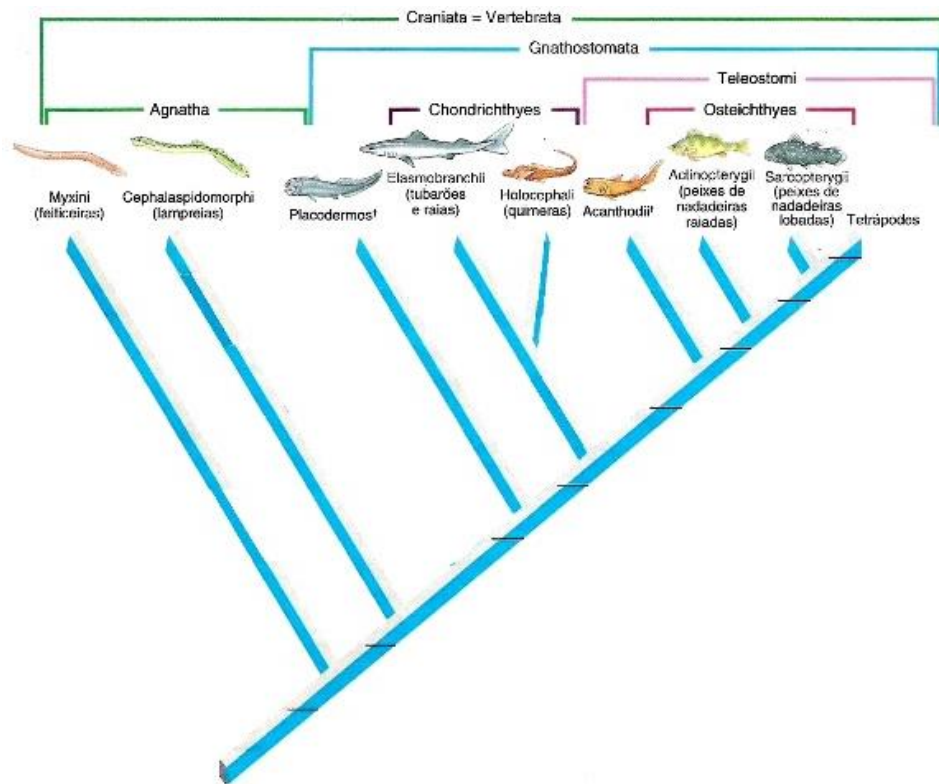
para a geração de renda e segurança alimentar, a aquicultura possibilita o reuso da água após passar pelo sistema de produção dos organismos aquáticos, o que favorece regiões que possuem restrições hídricas como o Nordeste (SILVA et al., 2014). Em suma, tanto a aquicultura quanto a pesca são atividades importantes como fontes de renda, além de proporcionarem fonte de alimento para diversos países, especialmente àqueles que não têm acesso ao mar e que possuem baixa renda com déficit alimentício (FAO, 2018).

1.2. Peixes

Os peixes são um dos grupos mais diversos existentes. Segundo o Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade (ICMBio), até o ano de 2005 existiam cerca de 25.000 espécies viventes no mundo. No Brasil, a ictiofauna consiste em cerca de 2.300 peixes marinhos (REIS et al., 2003) e aproximadamente 1.300 espécies de peixes de água doce (MENEZES et al., 2003). Espera-se que exista um número ainda maior, visto que dezenas de espécies são descritas a cada ano. Apesar desta grande variedade, seja morfológica ou no ciclo de vida, os peixes têm uma continuidade evidente em sua linha filogenética.

No ponto de vista da sistemática filogenética, “peixe” é uma denominação parafilética, ou seja, que não abrange todos os descendentes de seu ancestral comum, sendo assim, não representam um grupo natural (ROSA; LIMA, 2005). Desta forma, os peixes podem ser divididos didaticamente em: Agnatha, cujo grupo é constituído pelas lampreias (Cephalaspidomorphi) e peixes-bruxas (Myxini); Chondrichthyes, conhecidos como peixes cartilagosos (tubarões, raias e quimeras); e Osteichthyes que são os peixes ósseos. Dentro deste grupo encontramos ainda dois “sub grupos” que são os peixes de nadadeiras raiadas (Actinopterygii) e os peixes de nadadeiras lobadas (Sarcopterygii) (Fig. 2).

Figura 2 – Árvore filogenética de Craniata, clado que inclui Agnatha, Gnathostomata e Tetrapoda



Fonte: Adaptado de Hickman (2016).

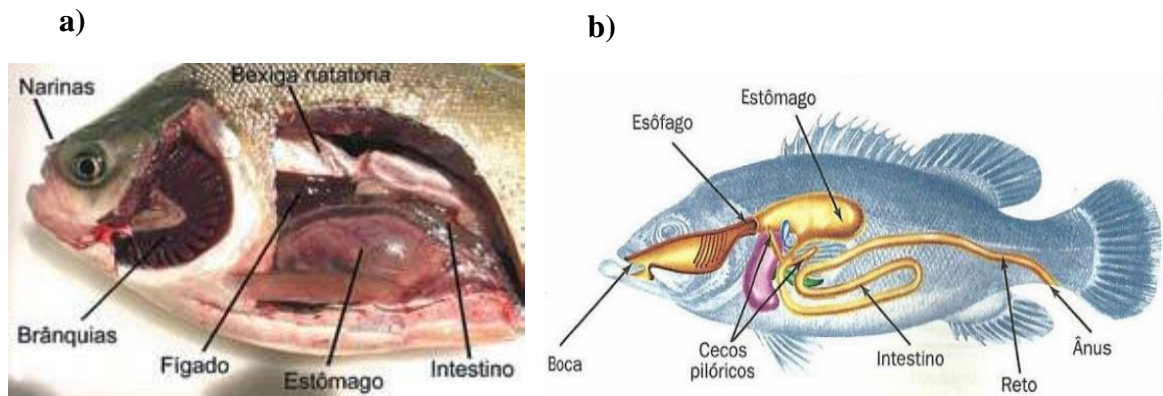
Os peixes são predominantemente criaturas neríticas, entretanto, eles ocupam os mais diversos ambientes, desde o domínio mesopelágico até as zonas mais profundas como as zonas abissais (PEREIRA; GOMES, 2009). Atrelado a isto, esses animais têm grande capacidade de mobilidade podendo ocupar diversos habitats. São tipicamente ectodérmicos, ou seja, não têm a capacidade, assim como os mamíferos e as aves, de controlar sua temperatura interna. Desta maneira, muitas espécies realizam grandes migrações seguindo massas de águas que esteja de acordo com a temperatura ideal para eles.

Cada espécie possui suas particularidades, seja na reprodução ou em seu ciclo de vida. Entretanto, apesar dos diferentes hábitos alimentares, juntamente com a diversidade das estruturas do trato digestório, os peixes podem ser divididos em grandes grupos: detritívoros, que se alimentam de matéria orgânica; herbívoros, cuja dieta é restrita a vegetação presente no ambiente (geralmente algas); onívoros, os quais são generalistas, explorando uma grande diversidade de alimentos disponíveis (ROTTA, 2003) e carnívoros, os quais se alimentam de outros animais. O trato digestório destes animais difere dos animais terrestres, em consequência de que os alimentos disponíveis no meio aquático podem não estar disponíveis

no ambiente terrestre. Uma das diferenças está na ausência das glândulas salivares (PEISONG et al., 2004), além disso, as alterações estão relacionadas quanto ao tamanho, forma e posição dos órgãos.

Apesar destas diferenças, em geral, os processos de digestão dos peixes são semelhantes aos dos outros vertebrados. O trato gastrointestinal dos peixes dividem-se em cavidade oral, estômago, intestinos anterior, médio e posterior, além de incluir o esôfago, os cecos pilóricos, o pâncreas, a vesícula biliar e o fígado como órgãos acessórios (ROTTA, 2003) (Fig. 3). O estômago é responsável por armazenar temporariamente o alimento, além de que desempenha funções que auxiliam na trituração do alimento. A superfície interna, também conhecida por mucosa, contém células que produzem o muco e o suco gástrico, rico em enzimas digestivas as quais são responsáveis pela atividade química da digestão (ROTTA, 2003).

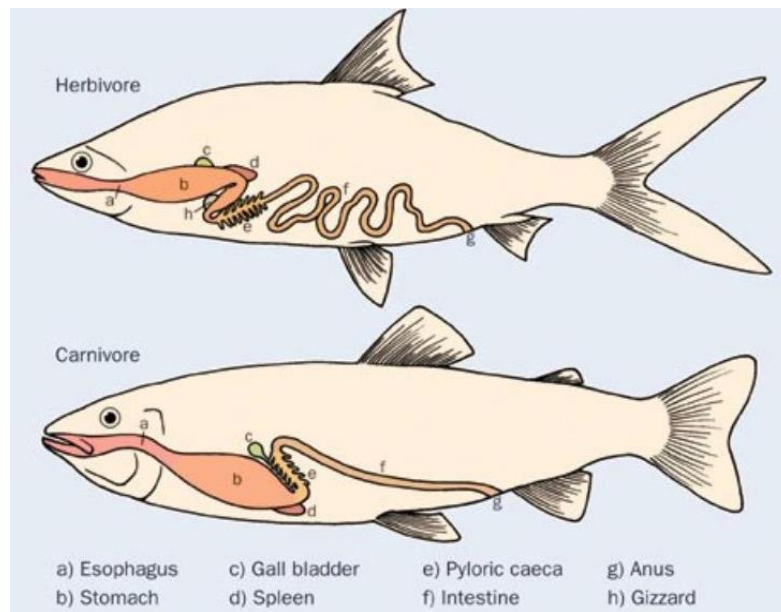
Figura 3 – Representação geral do sistema digestório dos peixes



(a) Órgãos internos de um peixe pertencente à família Characidae. Fonte: <http://panoramadaaquicultura.com/paginas/Revistas/62/MONITORANDOPEIXES.asp>; (b) Desenho esquemático do sistema gastrointestinal de um peixe ósseo. Fonte: <https://www.veterinariadigital.com/articulos/enzimas-digestivas-en-peces/>

Já no intestino é onde se completa a digestão iniciada no estômago e também onde ocorre a maior parte da absorção dos nutrientes. Ele pode mudar quanto ao seu comprimento de acordo com a alimentação do animal (ROTTA, 2003). Os carnívoros possuem intestinos curtos devido a menor quantidade de alimento ingerida e ao alto valor nutritivo, em contradição dos herbívoros que se alimentam muito, porém, sua alimentação consiste de baixo valor nutricional (Fig. 4). Dessa forma, o alimento se distribui em um intestino longo, permitindo-o permanecer por mais tempo no trato digestório, aumentando a eficiência digestória (ROTTA, 2003).

Figura 4 – Desenho esquemático comparativo do sistema digestivo de um peixe herbívoro e um peixe carnívoro



Fonte: <http://www.lebas.com.mx/files/Anatomia-digestiva-de-los-peces>

Em suma, os peixes têm grande importância ecológica, pois participam na formação e estruturação do ecossistema que fazem parte. Ocorrendo em diferentes níveis tróficos, desde detritívoros até predadores de topo, eles podem afetar a abundância, a composição e a distribuição de diferentes comunidades (ROSA; LIMA, 2005). Além disso, é indiscutível a importância dos peixes para a economia já que é um dos principais alimentos da população mundial. Fazem-se relevantes tanto em sua participação na produção pesqueira mundial, a exemplo do xaréu, como também através da criação de peixes de água doce, a exemplo do tambaqui, cujo peixe é um dos mais cultivados no Brasil.

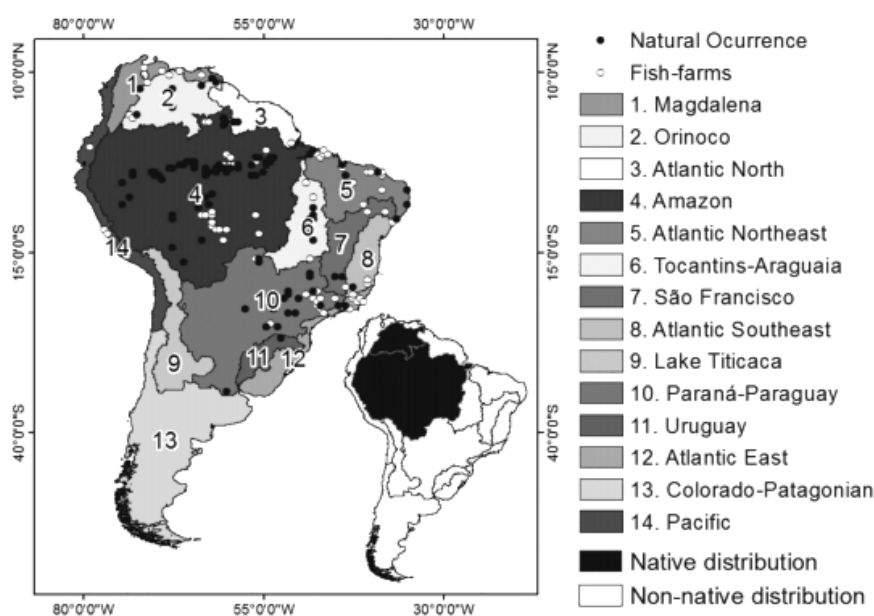
1.2.1. Tambaqui (*Colossoma macropomum*)

O tambaqui (*C. macropomum*) é um peixe de água doce, representante da família Characidae, inserido na classe Actinopterygii e ordem Characiforme (Tabela 1). Ocorre naturalmente nas bacias dos rios Amazonas e Orinoco e é fortemente distribuída na América do Sul e em diferentes países da América Central e Ásia devido à piscicultura (Fig. 5). É o segundo maior peixe da Bacia Amazônica, perdendo apenas para o pirarucu (*Arapaima gigas*), podendo atingir o comprimento de até 1 metro e pesar até 30 kg (GOULDING; CARVALHO, 1982).

Tabela 1 – Classificação Taxonômica do Tambaqui (*C. macropomum*)

Reino	Animalia
Filo	Chordata
Classe	Actinopterygii
Ordem	Characiformes
Família	Characidae
Subfamília	Serrasalminae
Gênero	<i>Colossoma</i>
Espécie	<i>Colossoma macropomum</i>

Fonte: Autora (2019).

Figura 5 – Distribuição de *Colossoma macropomum*

Fonte: Lopes et al. (2017)

Acerca de sua biologia, esta espécie é geralmente solitária e pode ser considerada potamódroma, ou seja, realiza migrações entre diferentes massas de água doce. Isto porque é um peixe reofílico, o qual precisa nadar contra a correnteza dos rios para amadurecer as gônadas e procriar, atingindo a maturidade sexual entre três e quatro anos. Os jovens e os juvenis vivem em águas negras de planícies aluviais até atingir a maturidade sexual, e quando adultos permanecem em florestas inundadas durante os primeiros meses de inundação (GOULDING; CARVALHO, 1982). São animais bento-pelágicos que vivem em profundidades a partir de cinco metros.

Quanto às suas características morfológicas, o tambaqui possui o corpo romboidal, com a coloração geralmente clara na parte superior, variando de amarelo a verde-oliva e negra

na metade inferior (Fig. 6), podendo variar com a composição da água em que se encontra. Uma particularidade desta espécie é possuir muitos rastros branquiais, os quais aumentam de número à medida que o indivíduo cresce. Estas estruturas desenvolvidas estão associadas com a filtragem do zooplâncton (LIMA; GOULDING, 1998).

Figura 6 – Tambaqui (*Colossoma macropomum*)



Fonte: <https://www.fishbase.de/photos/PicturesSummary.php>

O tambaqui é uma espécie onívora, podendo se alimentar de diferentes tipos de alimentos. A presença de dentes molariformes em sua cavidade bucal, além de possuir lábios carnosos, permite esta dieta generalista. Conforme o peixe cresce, sua alimentação muda. Quando jovens, a preferência é por zooplâncton, mas este alimento vai se tornando secundário progressivamente, tendo preferência por sementes e frutos quando adultos (CARVALHO, 2007). Esta espécie possui o estômago bem definido, alongado e elástico, e possuem cecos pilóricos numerosos, facilitando a digestão dos alimentos (GOULDING; CARVALHO, 1982). Ainda, o intestino é relativamente longo, podendo medir cerca de três vezes o comprimento do seu corpo.

O tambaqui é o peixe nativo mais produzido no Brasil (CORRÊA et al., 2018). Em 2016, constituiu cerca de 30% de todos os peixes cultivados no país, representando uma despesa de aproximadamente 137 mil toneladas (IBGE, 2016). Sua rusticidade favorece tanto a criação em sistemas semi-intensivos (barragens, viveiro e tanques), quanto em sistemas intensivos em tanques com aeração mecânica e tanques-rede (CORRÊA et al., 2018). Seu largo cultivo se deve também ao domínio das técnicas de produção de larvas, qualidade da carne, além que são resistentes a doenças. Até o momento não foi registrado nenhuma doença endêmica para o tambaqui, seja o cultivado ou o silvestre (CARVALHO, 2007).

Apesar de seu cultivo ser possível em todo território brasileiro, vale salientar que o tambaqui é sensível a temperaturas menores que 18°C, onde sua temperatura ótima está em

torno de 22°C a 28°C (CORRÊA et al., 2018). Desta maneira, as regiões Norte, Nordeste e Centro-Oeste detêm a maior produção e cultivo de tambaqui do país devido ao clima propício, além de sua boa aceitação no mercado.

1.2.2. Xaréu (*Caranx hippos*)

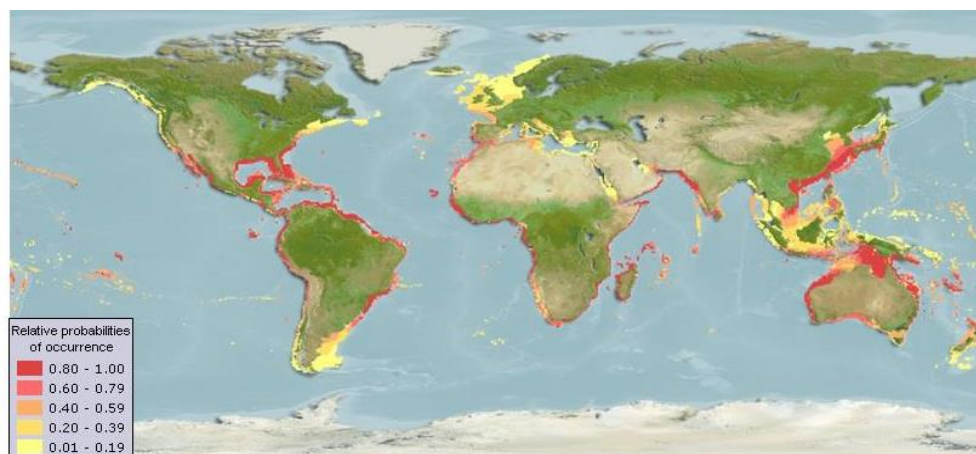
O xaréu (*C. hippos*), diferente do tambaqui, é uma espécie marinha pertencente à família Carangidae, classe Actinopterygii e ordem Perciformes (Tabela 2). Sua distribuição em relação ao Atlântico Oriental se estende desde Portugal até a Angola, incluindo o Mediterrâneo, e quanto ao Atlântico Ocidental inclui Nova Escócia, Canadá e o norte do Golfo do México ao Uruguai (Fig. 7). Encontra-se em águas neríticas do litoral, onde é comum em águas rasas tendo preferência a profundidades de até 200 metros, e geralmente estão associados a recifes de corais (BAUCHOT, 2003). Apesar do hábito pelágico, o xaréu pode ser encontrado também em estuários e lagoas costeiras quando juvenis.

Tabela 2 – Classificação Taxonômica do Xaréu (*C. hippos*)

Reino	Animalia
Filo	Chordata
Classe	Actinopterygii
Ordem	Perciformes
Superfamília	Percoidea
Família	Carangidae
Gênero	<i>Caranx</i>
Espécie	<i>Caranx hippos</i>

Fonte: Autora (2019).

Figura 7 – Distribuição de *Caranx hippos*



Fonte: www.aquamaps.org

Na costa brasileira, podemos encontrar seis espécies diferentes do gênero *Caranx* sp., todos com suas particularidades que os distinguem entre eles. Os xarés no geral são peixes que possuem o corpo alongado e fusiforme. Caracterizam-se pela presença de escudos, os quais são escamas modificadas (ROCHA; COSTA, 1999), provavelmente uma adaptação para a defesa. Já o *Caranx hippos*, popularmente conhecido por “xaréu-cabeçudo”, é facilmente distinguido das demais espécies devido à curvatura acentuada da cabeça, daí o nome pelo qual ele é conhecido. Além disso, esta espécie possui algumas características particulares, como uma macha negra ovalada presente no opérculo, próximo ao olho e também presente na nadadeira peitoral (Fig. 8).

Figura 8 – xaréu (*Caranx hippos*)



Fonte: <http://peixesdesportivosdomundo.blogspot.com/2009/12/o-xareu-macoa-caranx-hippos.html>

São animais carnívoros, alimentando-se de peixes menores e alguns invertebrados, e quando jovens têm preferência por zooplâncton e crustáceos (LUQUE; ALVES, 2001). O xaréu é um peixe oceanódromo, ou seja, realiza migrações em diferentes massas de água oceânicas, neste caso, para reprodução. Além disso, possuem grande porte podendo ultrapassar 1 metro de comprimento e chegam a pesar até 25 kg. Possuem o corpo alongado e levemente achado lateralmente. Sua coloração típica é cinza prateado, com tonalidades que variam em esverdeadas no dorso e amareladas na metade inferior. As nadadeiras dorsal e anal são amarelas e ao ficarem estressados ou em época de acasalamento podem ficar quase totalmente pretos.

Devido ao seu grande porte, o *C. hippos* é muito almejado na pesca esportiva. Além disso, o xaréu possui grande importância econômica devido à demanda nos mercados e peixarias no litoral brasileiro. Segundo o boletim estatístico da pesca e aquicultura publicado pelo Ministério da Pesca e Aquicultura (MPA), a produção do xaréu através da pesca

extrativista alcançou cerca de 2.500 t. Vale ressaltar que este valor é referente ao ano de 2011, e desde então não há dados oficiais consolidados sobre a atividade pesqueira no Brasil.

1.3. Processamento de Resíduos Sólidos

Segundo o relatório emitido pela FAO (2018), em 2016 aproximadamente 88% das 171 milhões de toneladas de produção total de peixe foi destinado ao consumo humano. O restante foi utilizado para fins não alimentares, sendo empregado, principalmente, na produção de farinha e óleo de peixe, além de ter sido amplamente utilizado na aquicultura e pecuária para alimentação de animais. Neste mesmo documento foi relatado que desde a década de 1960 até 2016 o consumo médio anual de peixes duplicou, atingindo uma taxa média de 1,5% ao ano, superando até mesmo o crescimento populacional.

Durante o processamento industrial de peixes, cerca de 70% corresponde a rejeitos. Dentre estes resíduos podem-se citar as vísceras, as escamas, pele e cabeça (SILVA, et al., 2014). Este fato ocasiona um problema, pois o pescado constitui umas das principais fontes de alimento para a população, além disso, é visto um aumento na produção e consumo de peixe. Desta maneira, o processamento do pescado gera grande quantidade de resíduos que na maioria das vezes são descartados *in natura* em aterros (Fig. 9) e acarretam aumento da poluição ambiental (SILVA et al., 2019). Agregado a isto, poucas indústrias fazem proveito destes rejeitos, se transformando, então, um desafio para que essas atividades, seja de pesca ou aquicultura, se tornem sustentáveis.

Figura 9 – Rejeitos de pescado descartados em rio

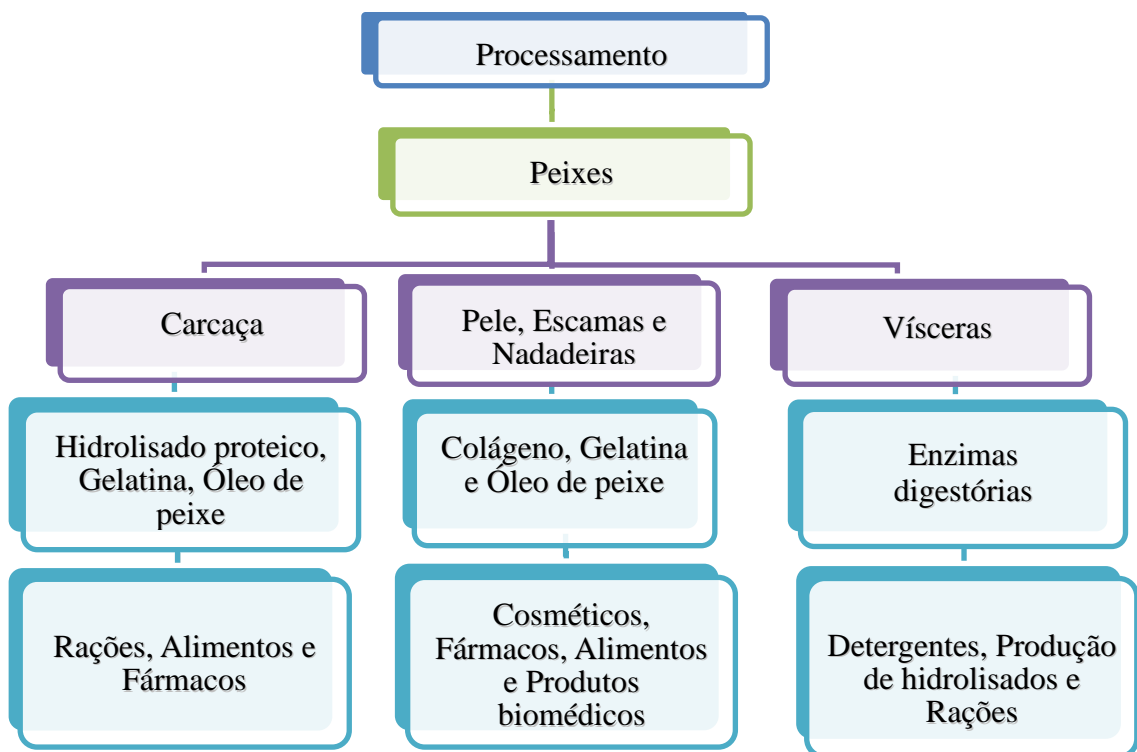


Fonte: <https://www.espiritosantonoticias.com.br/visceras-de-peixe-poderao-deixar-de-ser-jogadas-no-rio/>

Tendo em vista este crescente problema, pesquisadores e empresários de diversos países começaram a desenvolver pesquisas com o intuito de aproveitar essa biomassa de resíduos. Ainda é pequeno o aproveitamento destes rejeitos pela indústria para a fabricação de produtos de baixo valor agregado como óleo de peixe e farinha de peixe de baixa qualidade (SILVA et al., 2014). Pode haver outras formas de destinação alternativa para estes rejeitos, entre eles está o uso em artefatos de couro, podendo ser utilizada na fabricação de bolsas, botas e carteiras, ainda, o óleo do peixe pode ser aplicado na produção de combustível, e também utilizado para compostagem, este último tem a vantagem por possuir baixa exigência de infraestrutura (CHAVES; VINK, 2017).

Várias pesquisas têm demonstrado que esses resíduos são fontes importantes de biomoléculas com potencial industrial e biotecnológico (Fig. 10). Dentre estas biomoléculas estão o colágeno, gelatina, quitina, polissacarídeos sulfatados e os peptídeos antimicrobianos (BEZERRA; FREITAS-JÚNIOR, 2015; BKHAIRIA et al., 2016; VILLAMIL et al., 2017; GOMEZ et al., 2018). Além disso, vários tipos de enzimas, incluindo proteases ácidas, podem ser extraídas de vísceras de peixes (OLIVEIRA et al., 2014; GOMEZ et al., 2018).

Figura 10 – Fluxograma dos resíduos de processamento do pescado e suas possíveis aplicações tecnológicas



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

1.4. Enzimas

As enzimas são proteínas, com exceção de um pequeno grupo de moléculas de RNA, as ribozimas (NELSON; COX, 2014). As suas estruturas proteicas, de primária a quaternária, são essenciais para o funcionamento das mesmas. Isso porque a atividade catalítica das enzimas depende de seu estado nativo, ou seja, caso ocorra uma desnaturação, por exemplo, sua atividade será perdida. As enzimas agem como catalisadoras, elas aceleram as reações químicas sem que sejam destruídas durante o processo e sem que ocorra o desequilíbrio das reações (ROCHA-FILHO; VITOLO, 2017). Desta maneira, são muito exploradas e utilizadas no campo industrial (FREITAS-JÚNIOR, 2010).

Geralmente, as enzimas não necessitam de outros compostos químicos, somente de seus próprios resíduos de aminoácidos. Em outros casos, algumas necessitam da associação de íons (Cu^{2+} , Fe^{2+} , K^+) para exercer seu papel catalítico, chamados de cofatores, ou com outras moléculas, as quais se denominam coenzimas (NELSON; COX, 2014). Exemplos clássicos de coenzimas são as moléculas NAD e FAD que participam do Ciclo de Krebs. Além de catalisadoras, as enzimas são altamente seletivas e específicas com o seu substrato. Em uma reação de catálise, a enzima se liga ao seu substrato formando um complexo denominado Enzima-Substrato (Fig. 11). Essa ligação não-covalente ocorre somente em uma região específica da enzima chamada sítio ativo, e para que uma molécula seja aceita como substrato ela necessita ter a forma de encaixe do sítio para que a enzima possa agir (CAMPBELL; FARRELL, 2015).

Figura 11 – Reação de catálise enzimática



E – Enzima; S – Substrato; P – Produto; ES – Complexo transitório da enzima com o substrato.

Fonte: <https://www.wikiwand.com/pt/Enzima>

A concentração de substrato, assim como a variação de temperatura e pH podem regular a atividade enzimática. Ainda, existem inibidores que podem interferir na ação e velocidade de uma reação catalisada pelas enzimas. De modo geral, os inibidores pode ser divididos em reversíveis e irreversíveis (CAMPBELL; FARRELL, 2015). Os inibidores reversíveis podem, ainda, ser competitiva, onde o inibidor possui a estrutura semelhante ao substrato, havendo, então, competição pelo sítio ativo da enzima; anticompetitiva, cujo inibidor se liga a outro local da enzima que não seja o sítio ativo, formando um complexo ESI

(Enzima-Substrato-Inibidor); ou mista. Já a inibição irreversível consiste na ligação covalente ou destruição de um grupo funcional da enzima.

Algumas enzimas são sintetizadas na forma de precursores inativos, denominado zimogênio. Para que o zimogênio seja ativado é necessário que ocorra hidrólise de certas ligações peptídicas que provocará mudanças conformacionais na mesma e fazendo com que apareça o sítio ativo funcional (NELSON; COX, 2014). O pepsinogênio, por exemplo, é o zimogênio da pepsina, a qual se insere no grupo das hidrolases (ZHAO et al., 2011). Segundo a *Nomenclature Committee of the International Union of Biochemistry and Molecular Biology* (NC-IUBMB), as enzimas são classificadas de acordo com as reações que elas catalisam (Tabela 3).

Tabela 3 – Classificação internacional das enzimas

Classe n°	Nome da Classe	Tipo de reação catalisada
1	Oxidoredutases	Reações de oxidação-redução
2	Tranferases	Reações de transferências de grupos
3	Hidrolases	Clivagem das reações adicionando água
4	Liasas	Clivagem de C-C, C-O, C-N ou outras ligações por eliminação de ligações duplas ou anéis, ou adição de grupos a ligações duplas
5	Isomerasas	Transferência de grupos dentro de uma mesma molécula produzindo formas isoméricas
6	Ligases	Formação de ligações C-C, C-S, C-O e C-N por reações acopladas à hidrólise de ATP ou cofatores similares

Fonte: Adaptado de Nelson e Cox (2014).

As reações de hidrólise, especificamente, catalisadas por enzimas denominadas hidrolases, são geralmente reações exergônicas, ou seja, reações que liberam energia (NELSON; COX, 2014). A formação de polímeros celulares a partir de suas subunidades por reações de condensação seria endergônica, o que não ocorre nas reações de hidrólise. De modo geral, as hidrolases catalisam a hidrólise de ligações covalentes e incluem enzimas de baixa especificidade, entre as proteases.

1.4.1. Proteases

Enzimas proteolíticas, ou proteases, são responsáveis pela catálise da quebra de ligações peptídicas (NELSON; COX, 2014) (Fig. 12). Segundo a NC-IUBMB, as proteases se inserem no subgrupo 4 do grupo 3 (hidrolases) na classificação das enzimas (Tabela 3). As

originadas a partir de animais possuem importância econômica, observa-se que as proteases animais são isoladas em grandes quantidades (ZHAO et al., 2011).

1.4.2. Proteases Ácidas

As proteases aspárticas são comumente chamadas de proteases ácidas e possuem em seu sítio ativo resíduos de ácido aspártico (MANDUJANO-GONZÁLEZ et al., 2016). São responsáveis por catalisar a clivagem de ligações peptídicas de proteínas digerindo-as em peptídeos menores (GURUMALLESH et al., 2019). Quanto à sua classificação fazem parte do grupo das endopeptidases; e possuem alta atividade e estabilidade em pH ácido. As proteases ácidas são essenciais para a vida podendo ser encontradas em diferentes organismos como animais, fungos, plantas e bactérias (MANDUJANO-GONZÁLEZ et al., 2016). Proteases ácidas incluem, entre diversas classes de enzimas, a quimosina, catepsina, renina e pepsina.

A pepsina (Fig. 13) encontra-se principalmente no suco gástrico do estômago de praticamente todos os vertebrados, podendo ser observada também em pequenas quantidades no sangue, urina e músculo, mas especificamente em peixes, a pepsina é encontrada frequentemente no estômago, sendo a principal enzima digestiva destes animais (ZHAO et al., 2011). Secretada através da mucosa gástrica no estômago, a pepsina é ativada a partir de seu zimogênio, o pepsinogênio (NELSON; COX, 2014). Em comparação a pepsina, o pepsinogênio é estável em ambientes alcalinos, na presença de HCl que possui pH ácido em torno de 1,5 e 2,0 ocorre autocatálise, de maneira que ativa a pepsina propriamente dita (ZHAO et al., 2011).

Figura 13 – Estrutura terciária da pepsina do peixe *Gadus morhua*



Fonte: Zhao et al. (2011).

A principal função da pepsina é a quebra das proteínas alimentares em peptídeos menores, e, para isso, a pepsina hidrolisa ligações peptídicas na porção N-terminal de resíduos de aminoácidos aromáticos como Fenilalanina, Triptofano e Tirosina (ZHAO et al., 2011). É considerada uma enzima promissora, visto que possui uma ampla quantidade de aplicações. Estudos mostram a extração e a aplicação da pepsina a partir das vísceras de peixes (SILVA et al., 2014; BKHAIRIA et al., 2016; GOMEZ et al., 2018) e uma delas é para a produção de colágeno. A extração de colágeno em meio ácido já é conhecida, entretanto, a pepsina pode ser utilizada para obter melhor rendimento, visto que esta enzima pode quebrar ligações peptídicas sem prejudicar sua estrutura proteica. Estudos relatam também que a pepsina é importante na medicina, podendo ser utilizada para a regulação intestinal e até mesmo ser utilizada como antisséptico bucal (ZHAO et al., 2011). Na produção de queijos, o coalho bovino pode ser substituído pela pepsina extraída do bacalhau a qual possui a mesma propriedade de coagulação, sendo até mais eficiente (BREWER et al., 1984).

Com base nestas informações, os rejeitos do processamento de tambaqui e xaréu, por serem espécies de alta produção, podem ser uma boa fonte destas biomoléculas, agregando valor a estes descartes e diminuindo o impacto ambiental da indústria aquícola e pesqueira. Desta forma torna-se necessário o desenvolvimento de estudos que obtenham, caracterizem e avaliem o potencial destas enzimas.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo Geral

Extrair e caracterizar proteases ácidas presentes nos estômagos dos peixes *Colossoma macropomum* e *Caranx hippos*.

2.2. Objetivos Específicos

- a) Obter extratos brutos com alta atividade proteolítica ácida a partir dos estômagos de *C. macropomum* e *C. hippos*;
- b) Determinar a temperatura ótima e estabilidade térmica para a atividade proteolítica ácida dos extratos obtidos;
- c) Determinar o pH ótimo e a estabilidade ao pH para a atividade proteolítica ácida dos extratos;
- d) Avaliar o efeito de íons metálicos, inibidor específico de proteases aspárticas e agente redutor sobre a atividade proteolítica ácida dos extratos;
- e) Avaliar o perfil eletroforético dos extratos através de zimografia.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Coleta das amostras e preparação do extrato bruto (EB)

As vísceras do tambaqui foram doadas pela Escola Agrícola de Jundiá (UFRN), enquanto que os estômagos do xaréu foram cedidos por peixarias localizadas na Praia da Penha, sendo então transportados sob refrigeração a 4°C para o Laboratório de Biomoléculas de Organismos Aquáticos (BiOAQUA/DBM/UFPB). Os estômagos foram pesados e homogeneizados mecanicamente utilizando uma solução de NaCl 0,9% (p/v) em água destilada de acordo com Santos et al. (2013). O extrato bruto (EB) do tambaqui foi obtido após acidificação com HCl 0,1 M por 20 minutos e o EB do xaréu foi acidificado com HCl 0,03 M por 1 hora. Ambos os extratos foram centrifugados a 9.000 rpm à 4°C durante 15 min e em seguida armazenados a -20°C para a posterior utilização.

3.2. Ensaio de atividade enzimática e determinação de proteínas totais

A atividade proteolítica ácida foi determinada de acordo com Pavlisko et al. (1997), utilizando como substrato uma solução de hemoglobina 2% (p/v) em HCl 0,03M. Os ensaios foram realizados em triplicata e o resultado foi determinado em leitor de microplacas Multiskan GO (Thermo®). Uma unidade de atividade enzimática foi determinada como sendo a quantidade de enzima capaz de promover uma alteração na absorbância a 280nm de 0,001 por minuto de reação. Já a quantificação de proteínas solúveis totais foi determinado através do método de Bradford et al. (1976) utilizando albumina de soro bovino (BSA) como padrão.

3.3. Caracterização físico-química das proteases ácidas

A atividade proteolítica ácida do EB do tambaqui e do xaréu foi caracterizada quanto aos efeitos do pH e temperatura sobre a mesma de acordo com Bkhairia et al. (2016). Para avaliar os efeitos da temperatura foram feitos testes com temperaturas entre 25°C e 65°C com acréscimo de 5°C a cada ponto experimental. Como substrato foi utilizado hemoglobina 2% em HCl 0,03 M. A estabilidade térmica da atividade enzimática foi determinada por incubação durante 30 min em temperaturas entre 25°C e 60°C. A enzima não aquecida foi considerada o controle (100%). O efeito do pH sobre a atividade enzimática do EB dos peixes foi realizada com tampões glicina-HCl 0,2 M (pH 1,5 a 2,5) e citrato-fosfato (pH 3,0 a 7,0), sendo a hemoglobina 2,5% em água destilada o substrato. Quanto à estabilidade ao pH, os ensaios foram realizados utilizando 20 µL do extrato bruto adicionados a 20 µL de tampão

com o pH desejado e condicionados em banho de gelo por 30 minutos. Em seguida, a esta mistura foi adicionada hemoglobina 2% e realizada a atividade enzimática a 37°C.

3.4. Efeito de íons metálicos e inibidores específicos

O efeito de íons metálicos sobre a atividade enzimática do EB do tabaqui foi avaliado incubando-se uma alíquota do extrato bruto com uma alíquota de solução de íons a 10 mM na proporção de 1:1 durante 30 minutos e, em seguida, realizado o ensaio de atividade enzimática. Os íons metálicos testados foram cloretos de alumínio (Al^{3+}), cobre (Cu^{2+}), magnésio (Mg^{2+}), chumbo (Pb^{2+}), manganês (Mn^{2+}), cálcio (Ca^{2+}), mercúrio (Hg^{2+}) e cádmio (Cd^{2+}), seguindo a metodologia de Santos et al. (2013). Foi feita uma pequena modificação ao avaliar a atividade enzimática do EB do xaréu aumentando a concentração dos íons de 10 mM para 20 mM. O efeito do inibidor de aspartato proteínases sobre a atividade enzimática do EB foi avaliado utilizando-se soluções de Pepstatina A (2mg/mL) para o xaréu e concentração de 50µg/mL para o tabaqui. O efeito do DTT (Ditiotreitol) (1mM), um agente redutor, sobre a atividade enzimática de ambos os peixes também foi avaliado para identificar a presença de pontes dissulfeto nas proteases ácidas do EB. Controles negativos e positivos foram realizados para cada solvente e inibidor.

3.5. Zimografia

Para a realização do zimograma utilizou-se a metodologia descrita por Garcia-Carreño et al. (1993) sendo feita uma PAGE em condição alcalina, sob uma amperagem fixa de 25 mA a 8°C. Após a corrida eletroforética, os géis foram incubados com solução de hemoglobina 2% em HCl 0,03 M por 1h e 30 minutos a 37°C, e, em seguida, os géis foram corados com o Comassie blue R-50 e descorados com ácido acético 10%.

3.6. Análises Estatísticas

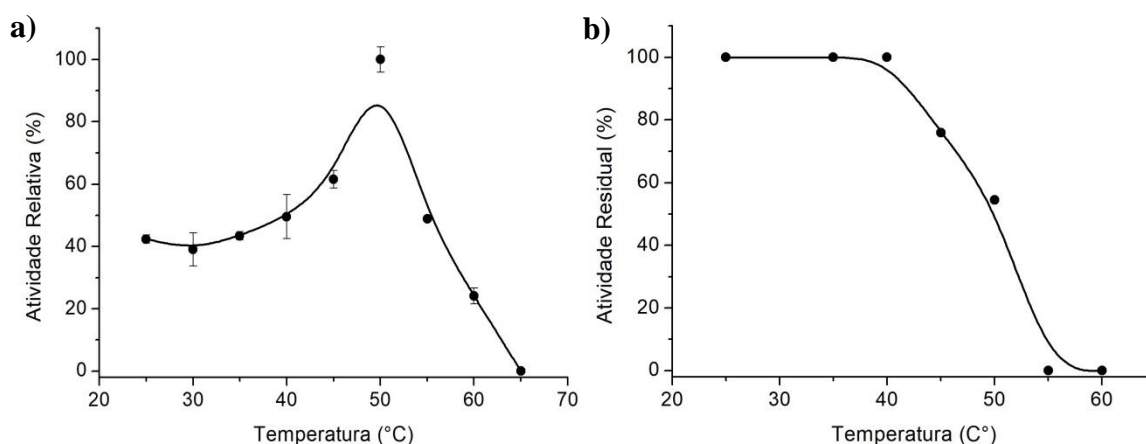
Os dados de inibição e efeito de íons foram analisados através de análise de variância ANOVA One-way e as médias foram comparadas através do teste de Tukey. O programa utilizado nas análises foi o OriginPro® 8 e o nível de significância foi de $p < 0,05$.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Atividade proteolítica ácida e efeito da temperatura na atividade e estabilidade das proteases ácidas

As enzimas proteolíticas presentes no EB do estômago de *C. macropomum* obtiveram uma atividade específica igual a $774,04 \pm 6,5$ U/mg. Pode-se observar que a atividade proteolítica ótima das proteases presentes no estômago do tambaqui foi alcançada na temperatura de 50°C (Fig. 14a), além de que as enzimas mantiveram mais de 40% da atividade máxima na temperatura de 55°C. Verificou-se, ainda, que a atividade enzimática caiu rapidamente para zero a 65°C. Na indústria, utilizam-se principalmente processos térmicos os quais deverão submeter à enzima. Desta maneira se faz necessário determinar sua temperatura ótima, ou seja, a temperatura na qual a enzima melhor trabalha, e, assim, determinar os processos pelas quais estas enzimas poderão ser expostas. A estabilidade térmica também é uma importante característica a ser determinada, pois mostra em quais faixas de temperatura a enzima estudada mantém sua estrutura nativa, além de determinar as condições de seu armazenamento. Desta maneira, pode-se observar que as proteases ácidas presentes no EB do tambaqui mantiveram 100% de sua atividade catalítica após exposição por 30 minutos às temperaturas de 25°C a 40°C (Fig. 14b). Ainda, nota-se que a atividade diminui drasticamente em temperaturas acima de 45°C.

Figura 14 – Efeito da temperatura sobre as proteases ácidas de *C. macropomum*



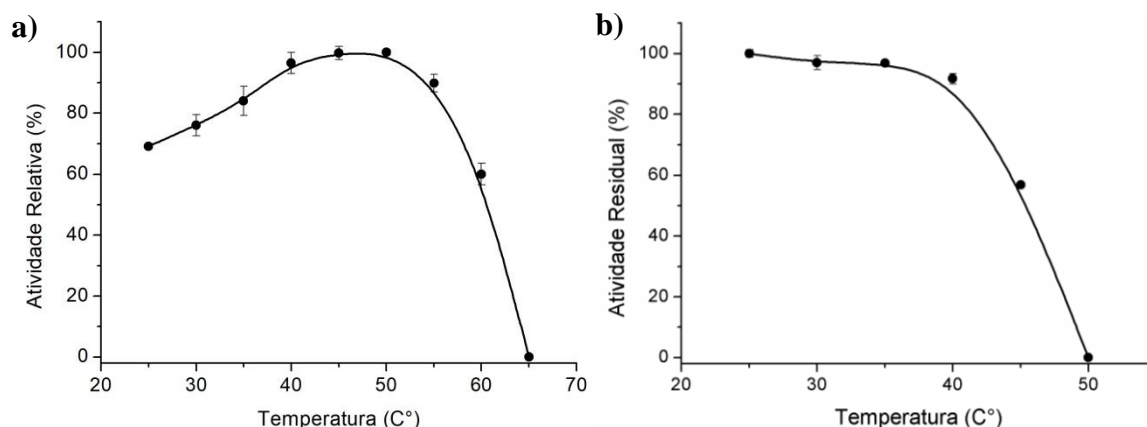
(a) Efeito da temperatura sobre a atividade proteolítica ácida; (b) Estabilidade térmica das proteases ácidas presentes no extrato bruto do estômago do tambaqui. Fonte: Autora (2018).

A atividade proteolítica do xaréu foi maior que a do tambaqui, correspondendo a $1.404,6 \pm 3,09$ U/mg. Isto pode ser explicado através do perfil digestivo destes animais. O tambaqui é um peixe onívoro, ou seja, é um animal generalista o qual se alimenta de todo tipo de alimento. Entretanto, o tambaqui possui preferência por sementes e frutos ao longo da vida, enquanto que o xaréu é estritamente carnívoro. Desta maneira, o tambaqui ingere alimentos com maiores teores de amido, enquanto que o xaréu que consome alimentos de origem animal possui uma dieta com maior teor proteico. Sendo assim, pode-se concluir que o tambaqui irá possuir menor quantidade de enzimas proteolíticas, as quais quebram proteínas, comparado ao xaréu. Ainda, segundo Dabrowski et al. (1992 apud MORO, 2013) a secreção destas enzimas não se restringe a dieta do animal, mas outros fatores também influenciam, como a temperatura ambiente, a quantidade de alimento ingerida e a frequência alimentar.

O efeito da temperatura na atividade proteolítica do EB do estômago do xaréu foi determinado pelo ensaio da atividade enzimática em diferentes temperaturas. As proteases aspárticas do xaréu possuíram uma faixa de temperatura ótima entre 35°C e 50°C (Fig. 15a). As atividades relativas a 40°C e 60°C foram de aproximadamente 96% e 60%, respectivamente. O perfil de estabilidade térmica mostrou que as proteases são altamente estáveis em temperaturas abaixo de 45°C, mas foi inativada em temperaturas mais altas (Fig. 15b).

Desta maneira, o EB do xaréu manteve aproximadamente 100% de sua atividade catalítica após a exposição por 30 minutos na faixa de temperatura de 25°C a 40°C (Fig. 15b), resultado também similar ao tambaqui. Entretanto, na temperatura de 50°C as enzimas foram desnaturadas, enquanto que o EB do tambaqui obteve atividade ainda de aproximadamente 50% nesta mesma temperatura. As enzimas a 35°C permanece quase que totalmente ativa após 30 min de incubação, indicando que estas proteases, tanto do xaréu quanto do tambaqui, podem ser utilizadas em processos de aquecimento moderado, além de poderem ser armazenadas em temperatura ambiente.

Figura 15 – Efeito da temperatura sobre as proteases ácidas de *C. hippos*



(a) Efeito da temperatura sobre a atividade proteolítica ácida; (b) Estabilidade térmica das proteases ácidas presentes no extrato bruto do estômago do xaréu. Fonte: Autora (2019).

Outros autores relataram temperatura ótima de proteases ácidas de diversos organismos entre 40 e 60°C, assim como demonstrado para as enzimas de ambas as espécies de peixe neste presente estudo. Segundo Zhao et al. (2011), peixes de águas frias apresentam a temperatura ótima das pepsinas relativamente baixas, diferente das espécies que habitam águas mais quentes. Isto pode explicar a temperatura ótima encontrada das enzimas de ambos os peixes ser relativamente alta, além de a estabilidade térmica ser semelhante, visto que são espécies que possuem preferência por águas mais quentes.

Bkhairia et al. (2016) estudou proteases ácidas presentes nas vísceras do peixe *Liza aurata* e obtiveram a temperatura ótima, assim como a estabilidade, como 40°C. Foi observada a desnaturação após exposição a 60°C. Gomez et al. (2018) estudaram proteases presentes em *Prochilodus lineatus* e encontraram a temperatura ótima igual a 45°C e permaneceram estáveis também até 45°C. Quanto aos autores Cuenca-Soria et al. (2014) relataram que as proteases ácidas do estômago do peixe *Cichlasoma urophthalmus* foram estáveis na faixa de temperatura entre 35°C e 45°C, obtendo atividade máxima em 55°C.

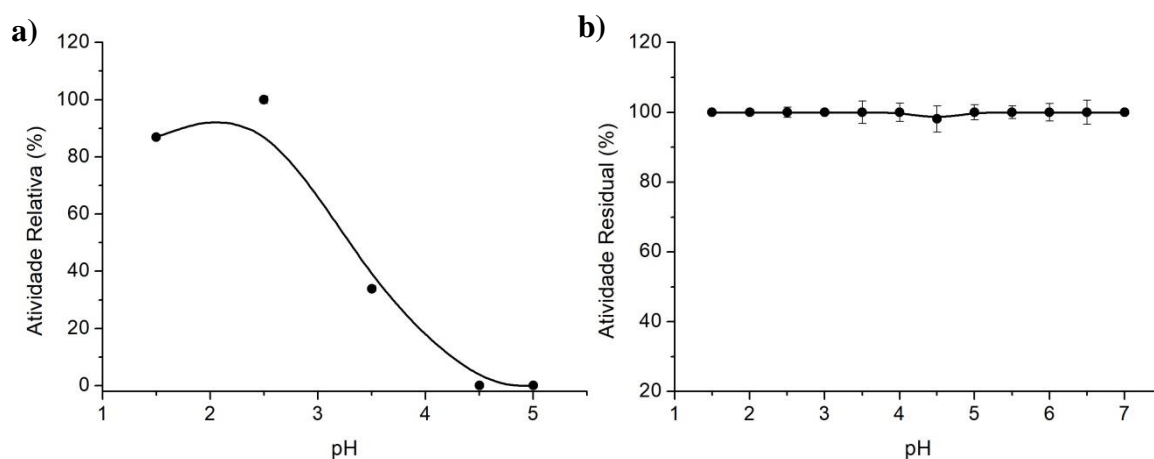
Resultados semelhantes ao presente estudo foram encontrados por Feijoo-Siota et al. (2018), os quais relataram para uma protease ácida de *Pichia pastoris*, uma espécie de levedura, temperatura ótima de 50°C, assim como Miura et al. (2015) para a pepsina purificada do peixe *Micropterus salmoides*. Estudos com espécies de fungos do gênero *Aspergillus* spp. foram relatados com variação de temperatura ótima entre 55°C e 60°C, além de estabilidade térmica entre 40°C e 60°C (SOUZA et al., 2017; PURUSHOTHAMAN et al., 2019). A variedade de resultados encontrados para a estabilidade térmica e a temperatura

ótima de proteases pode ser explicada devido aos diferentes tipos de organismos que foram estudados.

4.2. Efeito do pH na atividade e estabilidade das proteases ácidas

As enzimas têm um pH ótimo cuja atividade catalítica é máxima. Sabendo-se disso, determinar o pH ótimo de uma enzima, assim como sua estabilidade, é essencial para que seja possível avaliar os processos industriais em que poderão ser aplicadas e sua condição de armazenamento em solução, sem que ocorra degradação enzimática (SILVA et al., 2019). O pH ótimo para a atividade das proteases ácidas presentes no EB do tabaqui foi determinado como pH 2,5 (Fig. 16a). Em pH maior que 3,0 houve a diminuição da atividade enzimática substancialmente, onde em pH 4,5 já observa-se sua inatividade. Ainda, as proteases presentes no EB do estômago do tabaqui mantiveram-se estáveis na faixa de pH entre 1,5 e 7,0 (Fig. 16b). O fato das proteases ácidas do estômago de *C. macropomum* serem inativas a partir do pH 4,5 e estáveis na faixa de pH de 4,0 a 7,0 pode facilitar a comercialização destas enzimas em soluções estáveis, sem o risco de ocorrer proteólise.

Figura 16 – Efeito do pH sobre as proteases ácidas de *C. macropomum*



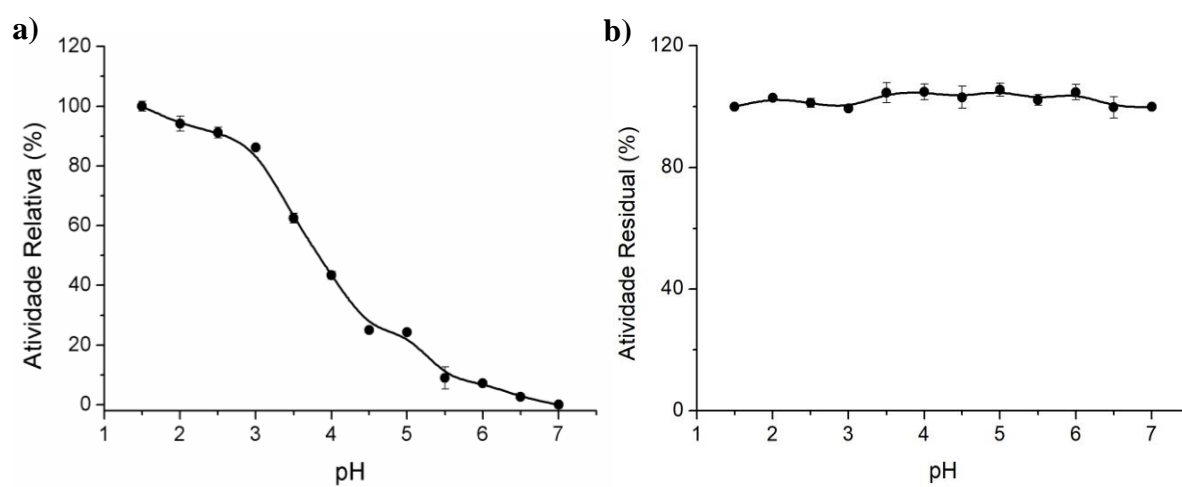
(a) Efeito do pH sobre a atividade proteolítica ácida; (b) Estabilidade ao pH das proteases ácidas presentes no extrato bruto do estômago do tabaqui. Fonte: Autora (2018).

Estudos anteriores mostram que o pH ótimo para proteases ácidas, entre elas a pepsina, estão em torno de 2,0 e 4,0 (CUENCA-SORIA et al., 2014). O pH ótimo encontrado por Bkhairia et al. (2016), Vannabun et al. (2014) e Cuenca-Soria et al. (2014) para as proteases ácidas do estômago das espécies de peixes *L. aurata*, *Pangasianodon gigas* e *C. urophthalmus*, respectivamente, foi igual a 3,0. Miura et al. (2015) encontraram um pH ótimo igual a 2,0 para uma pepsina do peixe *M. salmoides*. Kadek et al. (2014), para uma protease

ácida obtida da planta *Nepenthes gracilis*, relataram um pH ótimo de 2,2. Estes resultados mostram resultados próximos ao observado para as proteases ácidas de *C. macropomum*.

O efeito do pH na atividade enzimática do EB do xaréu foi determinado em um intervalo de 1,5 a 7,0 (Fig. 17b), resultado semelhante ao encontrado no tabaqui, enquanto que o ótimo foi encontrado em pH 1,5 (Fig. 17a), resultado diferente ao encontrado no tabaqui. A atividade relativa no pH 5,0 mostrou-se em torno de 25%, onde a atividade da protease diminuiu significativamente em pH 4,0.

Figura 17 – Efeito do pH sobre as proteases ácidas de *C. hippos*



(a) Efeito do pH sobre a atividade proteolítica ácida; (b) Estabilidade ao pH das proteases ácidas presentes no extrato bruto do estômago do xaréu. Fonte: Autora (2019).

Gomez et al. (2018) observaram um pH ótimo igual a 2,0 para as proteases do estômago do peixe *P. lineatus*, da mesma maneira que Bougatef et. al, (2008) para a espécie *Mustelus mustelus* e Nalinanon et. al, (2010) para a espécie *Thunnus alalunga*. Zhao et al. (2011) relataram que, a pepsina por atuar em meio ácido pode ocorrer a desnaturação em pH acima de 6,0. Entretanto, no presente estudo não foi o que aconteceu. A atividade proteolítica do EB do xaréu manteve-se estável na faixa de pH entre 1,5 e 7,0 (Fig. 17b). Pode-se observar resultado semelhante no *C. macropomum*, cujas proteases mantiveram-se estáveis mesmo em pH neutro. Este fato pode ser explicado através da presença de outras moléculas nos EBs, as quais podem contribuir com a estabilidade enzimática ao efeito do pH, o que poderia não ocorrer em enzimas purificadas.

Resultado semelhante foi encontrado por Bkhairia et al. (2016), onde as proteases do estômago do peixe *L. aurata* permaneceram estáveis na faixa de pH entre 3,0 e 7,0. As proteases ácidas presentes no estômago do peixe *P. lineatus* permaneceram estáveis apenas na

faixa de pH entre 1,0 e 5,0 (GOMEZ et al., 2018). Um estudo feito com a planta *Withania coagulans* mostrou proteases ácidas com estabilidade entre pH 1,5 e 9,0 (SALEHI et al., 2017). Purushothaman et al., (2019) relata pH ótimo igual a 3,5 e estabilidade de 2,7 até 6,5 por 24h a 30°C para a espécie de fungo *Aspergillus niger*.

Resultados anteriores reportados por Bezerra et al., (2000) mostraram resultados diferentes aos encontrados em *C. macropomum*, como por exemplo o pH ótimo igual a 1,7 e a temperatura ótima igual a 35°C. Estas diferenças podem ser explicadas através de polimorfismos presentes na espécie, além de diferentes fatores que influenciam o cultivo deste animal. O autor ainda relata que essas diferenças podem estar relacionadas a modificações genéticas que ocorre ao longo das gerações. Essas mudanças incluiriam mudanças estruturais em enzimas ou isoenzimas e, conseqüentemente, alterações em suas características catalíticas físicas e químicas (BEZERRA et al., 2000). Desta maneira, o presente estudo pode ser considerado um complemento do trabalho destes autores, visto que não foi realizado o zimograma e não foram avaliados os efeito de íons metálicos e DTT e da estabilidade ao pH.

4.3. Efeito de inibidores específicos enzimáticos e íons metálicos na atividade das proteases ácidas

Quanto aos inibidores de proteases, a Pepstatina A é um inibidor específico de proteases aspárticas, como a pepsina, impedindo sua ligação com o substrato (MOTWANI et al., 2015). Desta maneira, pode causar inibição total de sua atividade proteolítica, como demonstram outros trabalhos (CUENCA-SORIA et al., 2014; HSIAO et al., 2014; MIURA et al., 2015; WILKINSON et al., 2017) e observado também para a atividade proteolítica das proteases do EB de *C. macropomum* (Tabela 4) e de *C. hippos* (Tabela 5). Pode-se então concluir que as proteases presentes no extrato bruto do estômago do tambaqui e do xaréu são proteases aspárticas provavelmente do tipo pepsina símiles.

Tabela 4 – Efeito de inibidores e íons metálicos sobre a atividade das proteases ácidas do estômago de *C. macropomum*

Inibidor	Atividade Residual (%)	Inibição (%)
DTT	101,87 ± 5,5 ^b	0
Pepstatina A	0,00 ± 0,8 ^c	100
Íon		
Al ³⁺	26,47 ± 2,1 ^b	73,53
Ca ²⁺	127,69 ± 1,3 ^c	0
Cd ²⁺	26,19 ± 0,5 ^d	73,81
Cu ²⁺	34,55 ± 4,3 ^e	65,45
Hg ²⁺	107,79 ± 1,0 ^f	0
Mg ²⁺	23,66 ± 2,1 ^g	76,34
Mn ²⁺	24,88 ± 3,5 ^h	75,12
Pb ²⁺	104,22 ± 3,6 ⁱ	0
Controle	100 ± 0,0 ^a	0

Legenda: Letras sobrescritas diferentes significam diferenças estatísticas em relação ao controle segundo o teste de Tukey (p<0,05). Fonte: Autora (2019).

Tabela 5 – Efeito de inibidores e íons metálicos sobre a atividade das proteases ácidas do estômago de *C. hippos*

Inibidor	Atividade Residual (%)	Inibição (%)
DTT	96,64 ± 0,9 ^b	3,36
Pepstatina A	0,00 ± 0,6 ^c	100
Íon		
Al ³⁺	103 ± 2,3 ^b	0
Ca ²⁺	106 ± 0,4 ^c	0
Cd ²⁺	101 ± 2,1 ^d	0
Cu ²⁺	103 ± 2,8 ^e	0
Hg ²⁺	98 ± 0,4 ^f	2
Mg ²⁺	100 ± 1,6 ^g	0
Mn ²⁺	105 ± 1,6 ^h	0
Pb ²⁺	99 ± 0,3 ⁱ	1
Controle	100 ± 0,8 ^a	0

Legenda: Letras sobrescritas diferentes significam diferenças estatísticas em relação ao controle segundo o teste de Tukey (p<0,05). Fonte: Autora (2019).

O Ditiotreitól (DTT), um agente redutor, não promoveu efeito sobre a atividade enzimática das proteases ácidas do EB de *C. macropomum*, enquanto que no EB do

estômago de *C. hippos* o DTT promoveu leve inibição de apenas 3% (Tabela 5), demonstrando que as enzimas de ambas as espécies de peixe possivelmente não apresentam pontes dissulfeto em sua estrutura nativa.

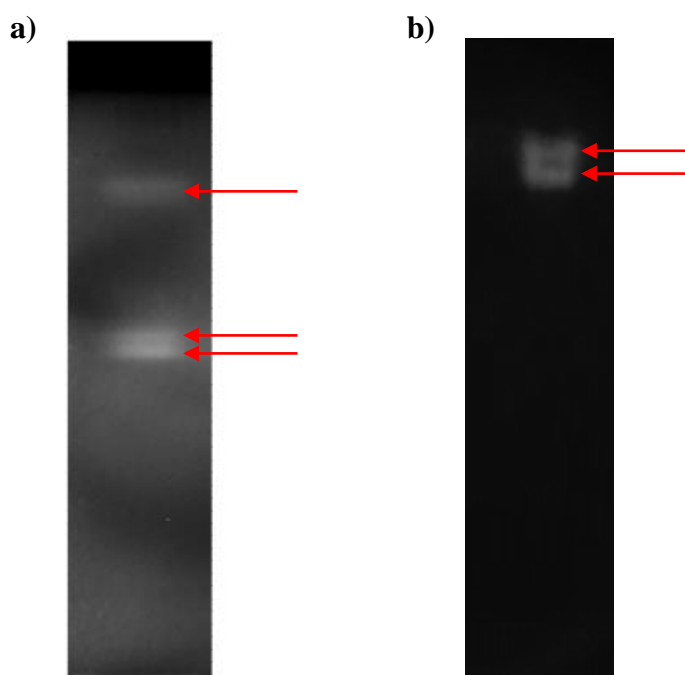
O estudo do efeito de íons metálicos sobre as enzimas de *C. hippos* é mostrado na tabela 5. Pode-se observar que os íons metálicos testados promoveram efeitos significativos sobre a atividade proteolítica do EB do xaréu. Apesar da variação na atividade promovida por vários íons e atestada pelas análises estatísticas, este efeito pode não ter grande influência na velocidade catalítica. Desta maneira, este resultado demonstra que as proteases ácidas presentes no extrato bruto do peixe xaréu apresentam-se ativas mesmo na presença de quantidades significantes de metais pesados. Este efeito poderia ser explicado pela interação dos metais com outras proteínas do extrato bruto, o que diminuiria seu efeito sobre as proteases. Apenas nos íons Pb^{2+} e Hg^{2+} pode-se observar leve inibição na atividade enzimática do EB do xaréu, entretanto, não pode ser considerada significativa.

Quanto ao tambaqui pode-se observar na tabela 4 que a atividade proteolítica destas enzimas foi fortemente inibida pelos íons metálicos Al^{3+} , Cd^{2+} , Cu^{2+} , Mg^{2+} , Mn^{2+} e sofreu ativação pelo íon Ca^{2+} . Nenhum efeito significativo foi observado em relação ao Hg^{2+} e Pb^{2+} nas concentrações testadas. Estudos relatam principalmente o efeito dos cloretos de Ca^{2+} e Mg^{2+} , onde foi encontrado que eles estimularam a atividade de várias pepsinas de peixe (GOMEZ et al. 2018). Segundo Souza et al. (2017), os íons metálicos Cu^{2+} e Mg^{2+} não promoveram efeitos sobre a atividade de uma protease ácida do fungo *A. foetidus*, sendo observado um ligeiro aumento da atividade proteolítica desta enzima na presença de Ca^{2+} . A ativação pelo Ca^{2+} reforça seu importante papel na estabilização da estrutura terciária de muitas enzimas (SUN et al., 2017). Segundo Gomez et al. (2018), o Ca^{2+} e Mg^{2+} estimularam a atividade das pepsinas presentes no estômago do peixe *P. lineatus* obtendo um aumento de 10% quando este íon foi adicionado à reação. Desta maneira, o Ca^{2+} é um importante produto que pode ser utilizado junto à enzima aumentando sua eficiência, além de ter obter custo-benefício.

4.4. Zimograma

A zimografia é um método de eletroforese que determina a presença de enzimas ativas em uma determinada amostra, de forma que se torna possível estimar o número de proteases presentes no extrato bruto. Desta maneira, foi possível observar a presença de três proteases ácidas no EB do estômago de *C. macropomum* (Fig. 18a) e duas proteases ácidas no EB do estômago de *C. hippos* (Fig. 18b), as quais podem ser isoformas de enzimas do tipo pepsinas.

Figura 18 – Zimograma dos EBs dos estômagos de *C. macropomum* e *C. hippos*



(a) Zimograma do EB de *C. macropomum*; **(b)** Zimograma do EB de *C. hippos*.

Legenda: As setas indicam a presença das proteases ácidas no extrato bruto.

Fonte: Autora (2019).

Outros estudos relataram somente uma protease ácida presente no zimograma do extrato bruto do peixe *L. aurata* (BKHAIRIA et al., 2016). Da mesma maneira para as proteases ácidas purificadas do fungo *A. foetidus* (SOUZA et al., 2017) e da planta *Withania coagulans* (SALEHI et al., 2017). Em outros trabalhos avaliando pepsinas purificadas de peixes são relatadas mais de duas isoformas desta enzima em diferentes espécies (ZHOU et. al, 2008; WU et. al, 2009; CAO et. al, 2010).

5. CONCLUSÕES

O estômago dos peixes *C. macropomum* e *C. hippos* é uma importante fonte de proteinases aspárticas, possivelmente do tipo pepsina-símile, com alta atividade proteolítica. Apesar do tambaqui e do xaréu pertencerem a diferentes nichos ecológicos e apresentarem hábitos alimentares distintos suas enzimas apresentaram características físico-químicas semelhantes, como a estabilidade térmica de 25°C a 40°C, estabilidade ao pH de 1,0 a 7,0 e temperatura ótima estabelecida como 50°C. A demanda por proteases com qualidades industriais, tais como alta atividade proteolítica e termoestabilidade, são altas. Desta maneira, a alta atividade destas enzimas em temperaturas elevadas e suas demais características físico-químicas demonstraram que as proteases ácidas presentes no estômago de *C. hippos* e *C. macropomum* são candidatas para aplicações em processos industriais. Além disto, possuem características, como a estabilidade em pH neutro que propiciam seu armazenamento em solução sem o risco de proteólise. Estudos futuros são necessários para otimizar as condições de obtenção, purificação, armazenamento e aplicação destas enzimas para que todo seu potencial seja determinado.

REFERÊNCIAS

- AGUILAR, J. G.; SATO, H. H. Microbial proteases: Production and application in obtaining protein hydrolysates. **Food Research International**, v. 103, p. 253–262, 2018.
- AHMAD, T.; ISMAIL, A.; AHMAD, S. A.; KHALIL, K. A.; KEE, L. T.; AWAD, E. A.; ADEYEMI, K. D.; SAZILI, A. Q. Autolysis of bovines kin, its endogenous proteases, protease inhibitors and their effects on quality characteristics of extracted gelatina. **Food Chemistry**, v. 265, p. 1–8, 2018.
- BAUCHOT, M. L. Faune des poissons d'eaux douces et saumâtres de l'Afrique de l'Ouest, Coll. Faune et Flore tropicales. **Musée Royal de l'Afrique Centrale, Tervuren, Belgique, Museum National d'Histoire Naturelle**, Paris, France and Institut de Recherche pour le Développement, Paris, France. 815 p, 2003.
- BEZERRA, R. D. S., SANTOS, J. F. D., LINO, M. A. D. S., VIEIRA, V. L. A., CARVALHO, L. B. Characterization of stomach and pyloric caeca proteinases of tambaqui (*Colossoma macropomum*). **Journal of Food Biochemistry**, v. 24, p. 189-199, 2000.
- BEZERRA, R. S.; FREITAS-JÚNIOR, A. C. V. Aproveitamento Integral do Pescado: novos horizontes para o fortalecimento da cadeia produtiva. **Panorama da Aquicultura**, v. 2, p. 48-53, 2015.
- BKHAIRIA, I.; MHAMDI, S.; JRIDI, M.; NASRI, M. New acidic proteases from *Liza aurata* viscera: Characterization and application in gelatin production, **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 92, p. 533–542, 2016.
- BOUGATEF, A.; BALTI, R.; ZAIED, S.; NASRI, M. Pepsinogen and pepsin from the stomach of smooth hound (*Mustelus mustelus*): Purification, characterization and amino acid terminal sequences, **Food Chemistry**, v. 107, p. 777–784, 2008.
- BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, v. 72, p. 248, 1976.
- BRASIL. Decreto-Lei nº 11.959, de 29 de junho de 2009. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**, Brasília, DF, 29 jun. 2009.
- BREWER, P.; HELBIG, N.; HAARD, N. F. Atlantic Cod Pepsin — Characterization and Use as a Rennet Substitute. **Canadian Institute of Food Science and Technology Journal**. v. 17, p. 38-43, 1984.
- CAMPBELL, M. K.; FARREL, S. O. Bioquímica. 2. Ed – **São Paulo: Cengage Learning**, 2015.
- CAO, M. J.; CHEN, W. Q.; DU, C. H.; YOSHIDA, A.; LAN, W.; LIU, G.; SU, W. Pepsinogens and pepsins from Japanese seabass (*Lateolabrax japonicus*), **Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology**, v. 158, p. 259–265, 2011.
- CARVALHO, E. V. M. M. Abordagens Biotecnológicas do Tambaqui (*Colossoma macropomum*). 98 p. Tese de doutorado - **Universidade Federal de Pernambuco, Recife – Pernambuco**, 2007.

CHAVES, P. T. C.; VINK, J. M. Rejeitos da atividade pesqueira no litoral do Paraná: Gestão atual e potencial para destinação alternativa. **Revista CEPSUL - Biodiversidade e Conservação Marinha**, v. 6, 10 p., 2017.

CORRÊA, R. O.; SOUSA, A. R. B.; MARTINS-JUNIOR, H. Criação de Tambaquis. Brasília, DF: **Embrapa**. 20p., 2018.

CREPALDI, D. V.; *et al.* A situação da Aquacultura e da pesca no Brasil e no mundo. **Rev Bras Reprod Anim**, v.30, p.81-85, 2006.

CUENCA-SORIA, C. A. *et al.* Partial characterization of digestive proteases of the Mayan cichlid *Cichlasoma urophthalmus*, **Fish Physiology and Biochemistry**, v. 40, p. 689–699, 2014.

DENG, J. J.; HUANG, W. Q.; LI, Z. W.; LU, D. L.; ZHANG, Y.; LUO, X. C. Biocontrol Activity of Recombinant Aspartic Protease from *Trichoderma harzianum* against Pathogenic Fungi. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 112, p. 35–42, 2018.

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

FEIJOO-SIOTA, L.; RAMA, J.; SÁNCHEZ-PÉREZ, A.; VILLA, T. Expression, activation and processing of a novel plant milk-clotting aspartic protease in *Pichia pastoris*, **Journal of Biotechnology**, v. 268, p. 28–39, 2018.

FREITAS-JÚNIOR, A. C. V. Purificação e caracterização de uma protease digestiva alcalina (tripsina) do peixe amazônico pirarucu (*Arapaima gigas*). 71 p. Dissertação (mestrado) – **Universidade Federal de Pernambuco, Centro de Ciências Biológicas. Bioquímica e Fisiologia**, 2010.

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

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

GOULDING, M.; CARVALHO, M. L. Life history and management of the tambaqui, (*Colossoma macroporum*, Characidae): an important Amazonian food fish. **Revista Brasileira de Zoologia**, v. 1, p. 107-133, 1982.

GURUMALLESH, P.; ALAGU, K.; RAMAKRISHNAN, B.; MUTHUSAMY, S. A systematic reconsideration on proteases. **International Journal of Biological Macromolecules**. v. 128, p. 254-267, 2019.

HSIAO, N. W. *et al.* Purification and characterization of an aspartic protease from the *Rhizopus oryzae* protease extract, Peptidase R. **Electronic Journal of Biotechnology**, v. 17, p. 89–94, 2014.

IBGE- Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. **Produção da pecuária municipal, Rio de Janeiro**, v. 44, p.1-51, 2016.

IPEA - Instituto de Pesquisa Econômica Aplicada. Evolução da piscicultura no Brasil: diagnóstico e desenvolvimento da cadeia produtiva de tilápia. **Rio de Janeiro: IPEA**, 2017.

KADEK, A.; TRETACHENKO, V.; MRAZEK, H.; IVANOVA, L.; HALADA, P.; REY, M.; SCHRIEMER, D.; MAN, P. Expression and characterization of plant aspartic protease nepenthesin-1 from *Nepenthes gracilis*. **Protein Expression and Purification**, v. 95, p. 121–128, 2014.

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

LI, Z. SCOTT, K.; HEMAR, Y.; ZHANG, H.; OTTER, D. Purification and characterisation of a protease (tamarillin) from tamarillo fruit. **Food Chemistry**, v. 256, p. 228–234, 2018.

LIMA, C. A.; GOULDING, M. Os frutos do tambaqui. Ecologia, conservação e cultivo na Amazônia. **São Paulo: Lithera Maciel Editora Gráfica**, 186p. 1998.

LIU, D. et al. Extraction and characterization of acid-and pepsin-soluble collagens from the scales, skins and swim-bladders of grass carp (*Ctenopharyngodon idella*). **Food Bioscience**, v. 9, p. 68–74, 2015.

LOPES, T. M. *et al.* Two sides of a coin: Effects of climate change on the native and non-native distribution of *Colossoma macropomum* in South America. **Plos One**, v. 12, n. 6, 2017.

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

MANDUJANO-GONZÁLEZ, V.; VILLA-TANACA. L.; ANDUCHO-REYES, M. A.; MERCADO-FLORES, Y. Secreted fungal aspartic proteases: A review. **Revista Iberoamericana de Micología.** v. 33, p. 76-82, 2016.

MENEZES, N.A.; BUCKUP, P.A.; FIGUEIREDO, J.L.; MOURA, R.L. Catálogo das espécies de peixes marinhos do Brasil. **São Paulo: Museu de Zoologia**, Universidade de São Paulo. 160p, 2003.

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

MORO, G. V. Carboidratos em dietas para o dourado *Salminus brasiliensis* (CUVIER, 1816). 102 p. Tese (doutorado) – **Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”**, 2013.

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

MPA - Ministério da Pesca e Aquicultura. Boletim estatístico da pesca e aquicultura. **Brasília: MPA**, 2011. 60p.

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

NELSON, D. L.; COX, M. M., Lehninger principles of biochemistry, 6th ed. **New York: W.H. Freeman**, 2014.

OLIVEIRA, V. M.; ASSIS, C. R. D.; BEZERRA, R. S. Hidrolases digestivas de peixes: aspectos bioquímicos, fisiológicos e biotecnológicos. **REB**, v. 7, p. 330-341, 2014.

PAVLISKO, A.; RIAL, A.; COPPES, Z. Characterization of trypsin purified from the pyloric caeca of the southwest Atlantic white croaker *Micropogonias furnieri* (Sciaenidae). **J. Food Biochem.** v. 21, p. 383–400, 1997.

PEISONG, M.; YANSONG, L.; KONDA, P.R.; WOON, K.C.; LAM, T.J. Characterization of the seabass pancreatic α -amylase gene and promoter. **General and Comparative Endocrinology**, v.137, p. 78–88, 2004.

PEREIRA, R.C; GOMES, A.S. Biologia marinha. 2° ed. – **Rio de Janeiro: Interciência**, 2009.

PURUSHOTHAMAN, K.; BHAT, S. K.; SINGH, S. A.; MARATHE, G. K.; APPU RAO, A. R. G. Aspartic protease from *Aspergillus niger*: Molecular characterization and interaction with pepstatin A. **International Journal of Biological Macromolecules**, In Press Journal Pre-proof, 2019.

REIS, R.E., KULLANDER, S.O.; FERRARIS, C.J. Check List of the Freshwater Fishes of South and Central America. **Porto Alegre: EDIPUCRS**. 742p, 2003.

ROCHA, G. F.; KISE, F.; ROSSO, A. M.; PARISI, M. G. Potential antioxidant peptides produced from whey hydrolysis with an immobilized aspartic protease from *Salpichroa organifolia* fruits. **Food Chemistry**, v. 237, p. 350–355, 2017.

ROCHA, L. O. F.; COSTA, P. A. S. Manual de Identificação de Peixes Marinhos para a Costa Central. **UNIRIO**, 1999.

ROCHA-FILHO, J. A.; VITOLO, M. Guia para Aulas Práticas de Biotecnologia de Enzimas e Fermentação. **São Paulo: Blucher**, 2017.

ROSA, R.S.; LIMA, F.C.T. Peixes, p.65-81. In: A.B.M. Machado, C.S. Martins e G.M. Drummond (org.). Lista da Fauna Brasileira Ameaçada de Extinção: Incluindo as Espécies Quase Ameaçadas e Deficientes em Dados. **Belo Horizonte, Fundação Biodiversitas**. 160p, 2005.

ROTTA, M. A. Aspectos gerais da fisiologia e estrutura do sistema digestivo dos peixes relacionados à piscicultura. **Corumbá: Embrapa Pantanal**, 48 p, 2003.

SALEHI, M.; AGHAMAALI, M.; SAJEDI, R.; ASGHARI, S.; JORJANI, E. Purification and characterization of a milk-clotting aspartic protease from *Withania coagulans* fruit. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 98, p. 847–854, 2017.

SANTOS, J. F.; CASTRO, P. F.; LEAL, A. L. G.; FREITAS-JÚNIOR, A. C. V.; LEMOS, D.; CARVALHO, L. B.; BEZERRA, R. S. Digestive enzyme activity in juvenile Nile tilapia

(*Oreochromis niloticus*, L) submitted to different dietary levels of shrimp protein hydrolysate. **Aquaculture International**, v. 21, p. 563-577, 2013.

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

SIVA, T. A.; et al. Avaliação do uso do estômago do peixe tambaqui (*Colossoma macropomum* Cuvier, 1818) como fonte de proteases ácidas industriais. In: SILVA, Thalia. Meio ambiente: uma visão interativa. João Pessoa: IMEA, 2019. p. 774-791.

SIQUEIRA, T.V. Aquicultura: a nova fronteira para aumentar a produção mundial de alimentos de forma sustentável. Boletim regional, urbano e ambiental. **IPEA**. 2017.

SOUZA, P. M. *et al*, Production, purification and characterization of an aspartic protease from *Aspergillus foetidus*. **Food and Chemical Toxicology**, v. 109, p. 1103–1110, 2017.

SUN, Q.; CHEN, F.; GENG, F.; LUO, Y.; GONG, S.; JIANG, Z. A novel aspartic protease from *Rhizomucor miehei* expressed in *Pichia pastoris* and its application on meat tenderization and preparation of turtle peptides. **Food Chemistry**, v. 245, p. 570–577, 2018.

TAVANO, O. L. Protein hydrolysis using proteases: An important tool for food biotechnology. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 90, p. 1–11, 2013.

VANNABUN, A. *et al*, Characterization of acid and alkaline proteases from viscera of farmed giant catfish, **Food Bioscience**, v. 6, p. 9–16, 2014.

VIDAL, M. F. Panorama da piscicultura no Nordeste. **Caderno Setorial ETENE**, ano 1, n. 3, novembro, 2016.

VILLAMIL, O.; VÁQUIRO, H.; SOLANILLA, J. F. Fish viscera protein hydrolysates: Production, potential applications and functional and bioactive properties. **Food Chemistry**, v. 224, p. 160-171, 2017.

WILKINSON, M. C.; NIGHTINGALE, D. J. H.; HARRISON, R. A.; WAGSTAFF, S. C. Isolation and characterization of renin-like aspartic-proteases from *Echis ocellatus* venom. **Toxicon**, v. 137, p. 92-94, 2017.

WU, T. *et al*, Identification of pepsinogens and pepsins from the stomach of European eel (*Anguilla anguilla*), **Food Chemistry**, v. 115, n. 1, p. 137–142, 2009.

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

ZHOU, Q.; LIU, G.; HUANG, Y.; WENG, L.; HARA, K.; SU, W.; CAO, M. Pepsinogens and Pepsins from Mandarin Fish (*Siniperca chuatsi*), **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 56, n. 13, p. 5401–5406, 2008.