



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO  
CENTRO DE BIOCIÊNCIAS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS



JESSICA COSTA DA SILVA

**OBTENÇÃO DE ENZIMA COLAGENOLÍTICA, COLÁGENO E HIDROLISADO  
PROTEICO A PARTIR DE RESÍDUOS DE ROBALO-FLEXA  
(*Centropomus undecimalis*)**

Recife  
2023

JESSICA COSTA DA SILVA

**OBTENÇÃO DE ENZIMA COLAGENOLÍTICA, COLÁGENO E HIDROLISADO  
PROTEICO A PARTIR DE RESÍDUOS DE ROBALO-FLEXA  
(*Centropomus undecimalis*)**

Tese apresentada ao Programa de  
Pós-Graduação em Ciências  
Biológicas da Universidade Federal  
de Pernambuco, como requisito  
parcial para obtenção do título de  
doutora em Ciências Biológicas

Área de concentração: Biotecnologia  
e Bioinformática

Orientador (a): Prof<sup>ª</sup> Dr<sup>ª</sup> Ana Lúcia Figueiredo Porto

Coorientador (a): Prof<sup>º</sup> Dr. Vagne de Melo Oliveira

Recife

2023

Catálogo na Fonte: Bibliotecário: Marcos  
Antonio Soares da Silva,  
CRB4/1381

Silva, Jessica Costa da.  
Obtenção de enzimas colágenolítica, colágeno e hidrolisado proteico a partir de resíduos de robalo- flexa  
(*Centropomus undecimalis*). / Jessica Costa da Silva. – 2023.

83 f. : il., fig.; tab.

Orientador: Ana Lúcia Figueiredo Porto. Coorientadora:  
Vagne de Melo Oliveira.

Tese (doutorado) – Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas da Universidade Federal de  
Pernambuco, 2023.

Inclui referências, anexos.

1. Resíduos pesqueiros. 2. I. Subprodutos de peixe. 3. Hidrólise proteica. I. Porto, Ana Lúcia Figueiredo.  
(Orient.). II. Oliveira, Vagne de Melo. (coorient.). III. Título.

JESSICA COSTA DA SILVA

**OBTENÇÃO DE ENZIMA COLAGENOLÍTICA, COLÁGENO E HIDROLISADO  
PROTEICO A PARTIR DE RESÍDUOS DE ROBALO-FLEXA  
(*Centropomus undecimalis*)**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito parcial para obtenção do título de doutora em Ciências Biológicas.

Aprovada em: 07/03/2023

**BANCA EXAMINADORA**

---

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Ana Lúcia Figueiredo Porto (Presidente)

Universidade Federal de Pernambuco

---

Prof<sup>o</sup>. Dr. Emmanuel Pontual Viana (Examinador Interno)

Universidade Federal Rural de Pernambuco

---

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Márcia Vanuza da Silva (Examinadora Interna)

Universidade Federal de Pernambuco

---

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Márcia Nieves Carneiro da Cunha (Examinador Externo)

Universidade Federal Rural de Pernambuco

---

Prof<sup>o</sup>. Dr. Vagne de Melo Oliveira (Examinador Externo)

Universidade Federal do Acre

A Deus, por acreditar em mim.

## **AGRADECIMENTOS**

A Deus, pela saúde, por ter me capacitado e permitir que eu pudesse desfrutar desse sonho perante um momento tão difícil, como a pandemia.

Aos meus pais Genival e Josilene, principalmente a minha mãe que sempre batalhou e lutou como pode para que eu tivesse educação de qualidade.

Ao meu irmão Giovanne pela força.

A minha orientadora Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Ana Porto pela confiança, paciência, ensinamentos, força e por ter aberto as portas do Labtecbioprot mesmo sem me conhecer, muito obrigada!

Ao Co-orientador Prof<sup>o</sup> Dr. Vagne Oliveira pelos ensinamentos, paciência, puxões de orelha, discussões, pois fizeram que eu crescesse não só na vida acadêmica como pessoalmente.

A toda equipe do Labtecbioprot pelo apoio e ao grupo de pescados pela parceria, companheirismo e momentos de descontração.

Ao Laboratório multiusuário da Ufrpe (LABMAQ).

A todos que contribuíram de forma direta e indiretamente para que esse trabalho fosse realizado.

Ao Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas (PPGCB) por toda a assistência e paciência dos coordenadores, secretária e estagiários.

As agência de fomento Fundação de Amparo a Ciência de Pernambuco (FACEPE) pela concessão da bolsa de doutorado, a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo financiamento dos projetos.

“Há um tempo determinado para todas as coisas debaixo do céu”. (BÍBLIA, ECLESIASTES, 3:1).

## RESUMO

Os peixes têm se tornado um produto de grande valia para os consumidores em geral, isto, devido ao seu consumo e demanda na produção por ser um alimento saudável e bastante recomendado em dietas nutricionais, onde pode-se encontrar grandes fontes de proteínas, vitaminas e ômega3. Em consequência desse alto consumo, surge um aumento significativo da quantidade de resíduos sólidos gerados pelas indústrias pesqueiras, que são descartados de maneira inadequada ao meio ambiente. O objetivo desse trabalho foi obter a enzima colagenolítica, colágeno e hidrolisado proteico a partir de resíduos do robalo-flexa (*Centropomus undecimalis*). Utilizou-se vísceras intestinais para obtenção da enzima colagenolítica (extrato bruto) e com Sistema de Duas fases Aquosas (SDFA), obteve o extrato parcialmente purificado. No SDFA, foi elaborado um planejamento fatorial 2<sup>4</sup>, foram analisados os efeitos das variáveis: massa molar do polietilenoglicol - PEG (400, 3350 e 8000), concentração de PEG (20, 22 e 24), concentração de citrato de sódio (15%, 20%, 22% e 25%) e pH (6, 7 e 8). Foi realizado o teste de inibidores com a enzima parcialmente purificada utilizando a Benzamidina (BEZN), Fenil-metil-sufonil fluoreto (PMSF), Tosil lisina clorometil cetona (TLCK) e Tosil fenilalanil clorimetil cetona (TPCK). A partir da pele foi obtido o colágeno ácido-solúvel (ASC) e colágeno pepsino-solúvel (PSC). Ambos os colágenos (ASC e PSC) foram caracterizados através da técnica eletroforese de SDS-PAGE e espectroscopia de infravermelho por transformada de Fourier (FT-IR). Foram obtidos hidrolisados proteicos a partir da ação da enzima colagenolítica do extrato bruto e parcialmente purificado utilizando os colágenos ASC e PSC. No processo de purificação por SDFA, a enzima teve predileção pela na fase PEG, apresentando fator de purificação e coeficiente de partição 3,91 e 14,78, respectivamente. A variável independente massa molar do PEG também apresentou efeito positivo no fator de purificação, enquanto que a concentração de polímero teve um efeito negativo para esta variável resposta. No teste de inibidores a enzima parcialmente purificada apresentou inibição de 74% na BENZ, 76% PMSF, 78% TLCKe 78% TPCK .O rendimento do colágeno ASC e PSC foram de 7,28% e 9,06%, respectivamente com base no peso seco. Na eletroforese, foi possível verificar o perfil dos colágenos com a presença de bandas (ASC e PSC) com variação de 200 kDa a 120kDa, sendo mais intensa no PSC. Na análise do colágeno através do FT-IR foram verificadas a presença de amida A, amida B e bandas de amida I, amida II e amida III. A hidrólise foi mais efetiva após 36 horas, apresentando pela eletroforese bandas mais intensas de massas molares de 70kDa e 32kDa. Diante desse estudo, foi possível agregar valor e verificar a importância do reaproveitamento dos subprodutos de peixes para a obtenção da enzima colagenolítica e colágeno, bem como a obtenção de hidrolisados proteicos que podem ser utilizados para a produção de ração, inclusive, para os próprios peixes e produção de peptídeos e sua potencialidade biológica.

**Palavras-chave:** Resíduos Pesqueiros, Subprodutos de Peixes, Hidrólise Proteica



## ABSTRACT

Fish have become a product of great value to consumers in general, due to its consumption and demand in production for being a healthy food and highly recommended in nutritional diets, where you can find great sources of proteins, vitamins and omega3. As a result of this high consumption, there is a significant increase in the amount of solid waste generated by the fishing industries, which are disposed of inappropriately to the environment. The objective of this work was to obtain the collagenolytic enzyme, collagen and protein hydrolyzate from the residues of the snook (*Centropomus undecimalis*). Intestinal viscera were used to obtain the collagenolytic enzyme (crude extract) and with the Aqueous Two Phase System (SDFA), the partially purified extract was obtained. In the SDFA, a 24 factorial design was elaborated, the effects of the variables were analyzed: molar mass of polyethyleneglycol - PEG (400, 3350 and 8000), concentration of PEG (20, 22 and 24), concentration of sodium citrate (15% , 20%, 22% and 25%) and pH (6, 7 and 8). The inhibitor test was performed with the partially purified enzyme using Benzamidine (BEZN), Phenyl-methyl-sulfonyl fluoride (PMSF), Tosyl lysine chloromethyl ketone (TLCK) and Tosyl phenylalanyl chlorimethyl ketone (TPCK). From the skin, acid-soluble collagen (ASC) and pepsin-soluble collagen (PSC) were obtained. Both collagens (ASC and PSC) were characterized using SDS-PAGE electrophoresis and Fourier transform infrared spectroscopy (FT-IR). Protein hydrolysates were obtained from the action of the collagenolytic enzyme of the crude extract and partially purified using ASC and PSC collagens. In the SDFA purification process, the enzyme had a predilection for the PEG phase, with a purification factor and partition coefficient of 3.91 and 14.78, respectively. The independent variable PEG molar mass also had a positive effect on the purification factor, while the polymer concentration had a negative effect on this response variable. In the inhibitor test, the partially purified enzyme showed inhibition of 74% in BENZ, 76% PMSF, 78% TLCK and 78% TPCK. The ASC and PSC collagen yield were 7.28% and 9.06%, respectively based on in dry weight. In electrophoresis, it was possible to verify the profile of the collagens with the presence of bands (ASC and PSC) ranging from 200 kDa to 120kDa, being more intense in the PSC. In the analysis of collagen through FT-IR, the presence of amide A, amide B and bands of amide I, amide II and amide III were verified. The hydrolysis was more effective after 36 hours, showing by electrophoresis more intense bands of molar masses of 70kDa and 32kDa. In view of this study, it was possible to add value and verify the importance of reusing fish by-products to obtain the collagenolytic enzyme and collagen, as well as obtaining protein hydrolysates that can be used to produce feed, including for the fish themselves. and production of peptides and their biological potential.

**Keywords:** Fish Waste, Fish By-Products, Protein Hydrolysis

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1	Espécie de robalo-flexa ( <i>C. undecimalis</i> ).	16
Figura 2	Processo de extração de colágeno a partir de resíduos de peixe métodos ácido e enzimático.	18
Artigo	Hidrólise do colágeno extraído do robalo-flexa ( <i>C. undecimalis</i> ) pelo método ASC (Colágeno ácido solúvel), utilizando amostras enzimáticas colagenolíticas de extrato bruto (EB) e Sistema de Duas Fases Aquosas (SDFA) em incubados em diferentes períodos de tempo (0, 12, 36, 48, 60, 72h) na temperatura de 37°C.	40
Figura 1		
Figura 2	Hidrólise do colágeno extraído do robalo-flexa ( <i>C. undecimalis</i> ) pelo método PSC (Colágeno pepsino-solúvel), utilizando amostras enzimáticas colagenolíticas de extrato bruto (EB) e Sistema de Duas Fases Aquosas (SDFA) em incubados em diferentes períodos de tempo (0, 12, 36, 48, 60, 72h) na temperatura de 37°C.	40
Figura 3	Hidrólise do colágeno comercial do tendão de Aquiles bovino utilizando amostras enzimáticas colagenolíticas de extrato bruto (EB) e Sistema de Duas Fases Aquosas (SDFA) incubados em diferentes períodos de tempo (0, 12, 36, 48, 60, 72h) na temperatura de 37°C.	41
Figura 4	Espectro de FTIR do colágeno ASC extraído da pele de robalo-flexa ( <i>C. undecimalis</i> ).	41
Figura 5	Espectro de FTIR do colágeno PSC extraído da pele de robalo-flexa ( <i>C. undecimalis</i> ).	42
Figura 6	Padrão SDS-PAGE de colágeno da pele de robalo-flexa ( <i>C. undecimalis</i> ). Marcadores proteína, corrida 1: ASC; corrida 2:PSC.	43
Figura 7	Padrão SDS-PAGE dos hidrolisados de colágeno da pele de robalo-flexa ( <i>C. undecimalis</i> ).	43

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	Espécies de peixes utilizadas para a produção de gelatina a partir de resíduos de pele	20
Tabela 2 -	Aplicações biotecnológicas das principais enzimas de peixes utilizados na indústria	24
Artigo 2	Tabela 1- Colágeno extraído a partir de resíduos de pele de diferentes espécies.	39

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ASC	Colágeno Solúvel em Ácido
ATR	Reflectância Total Atenuada
Azocoll	Azo dye-impregnated collagen
BAPNA	Benzoil arginina p-nitroanilida
BENZ	Benzamidina
CCIT	Concentração de Citrato de Sódio
ECA	Enzima conversora de angiotensina I
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
FP	Fator de purificação
FTIR	Infravermelho por transformada de Fourier
IV	Infravermelho
K	Coeficiente de partição
MPEG	Massa Molar do Polietileno glicol
Mm	Milimolar
PEG	Polietileno glicol
pH	Potencial hidrogeniônico
PMSF	Fenil-metil-sulfonil fluoreto
(p/v)	peso-volume
PSC	Colágeno Pepsino Solúvel
RPM	Rotações por minuto
TCA	Ácido tricloroacético
TLCK	Tosil lisina clorometil cetona
TPCK	Tosil fenilalanil clorometil cetona
SAPNA	Succinil- alanina-fenilalanina-p-nitroanilina
Y	Rendimento
μl	Microlitros
UV-vis	UV-vis

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b>	<b>12</b>
<b>2</b>	<b>OBJETIVOS</b>	<b>14</b>
2.1	Objetivo Geral	14
2.2	Objetivo Específico	14
<b>3</b>	<b>FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA</b>	<b>15</b>
3.1	Piscicultura e resíduos do pescado	15
3.2	Colágeno	16
3.3	Produtos obtidos a partir da hidrólise do colágeno	19
3.3	Produção de gelatina com pele de peixe	20
3.4	Peptídeos de colágeno de peixe	21
3.6	Resíduos do pescado como fonte de enzimas de interesse biotecnológico	
<b>4</b>	<b>ARTIGO1 - EXTRACTION OF COLLAGENOLYTIC ENZYME FROM FISH VISCERA BY PHASE PARTITIONING (PEG/CITRATE) AND ITS POTENTIAL FOR INDUSTRIAL APPLICATION</b>	<b>26</b>
	<b>ARTIGO 2 - OBTENÇÃO DO COLÁGENO E HIDROLISADO PROTEÍCO A PARTIR DE RESÍDUOS DO ROBALO-FLEXA (<i>Centropomus undecimalis</i>)</b>	<b>34</b>
<b>5</b>	<b>CONCLUSÕES</b>	<b>46</b>
<b>6</b>	<b>REFERÊNCIAS</b>	<b>48</b>
	<b>SÚMULA CURRICULAR</b>	<b>55</b>
	<b>ANEXOS</b>	<b>57</b>

## 1 INTRODUÇÃO

A cada dia os peixes têm se tornado um alimento bastante presente na mesa dos consumidores, devido a sua alta qualidade nutricional, tornando promissor o aumento da sua produção. Em paralelo ao consumo, destaca-se a grande quantidade de resíduos gerados, que na maioria das vezes são descartados de maneira inadequada ao meio ambiente (OLIVEIRA et al., 2017a), podendo ser obtidos diversas fontes de biomoléculas, entre elas, o colágeno e as enzimas (KARAYANNAKIDIS & ZOTOS, 2016; VIJI et al., 2019; VALIMAA et al., 2019).

A obtenção de colágeno a partir de resíduos de peixes não só adiciona valor significativo para o setor de processamento de peixes, mas também para as indústrias cosméticas, farmacológicas e terapêuticas (ZAMORANO-APODACA, et al., 2020). Na obtenção de enzimas não tem sido diferente, devido às suas moléculas biológicas ser uma fonte de baixo custo e de fácil acesso, tem se destacado em diversos segmentos terapêuticos, clínicos, biomédicos, alimentício, inclusive, na produção de ração animal (WANDERLEY et al., 2016; CHAUHAN et al., 2017).

A hidrólise enzimática do colágeno leva a produção de fragmentos comumente chamados de “peptídeos”. A enzima utilizada para essa clivagem é uma metaloprotease designada de “colagenase”, por ter a capacidade de clivar a tripla hélice dessa proteína (OLIVEIRA et al., 2017b).

Vários estudos têm tratado a hidrólise do colágeno para a produção de peptídeos bioativos e investigado as suas bioatividades e os seus efeitos biológicos, usando modelos de ensaio *in vitro* e *in vivo*. Dentre as inúmeras funções biológicas desses peptídeos, as atividades antioxidante, anti-hipertensiva, antimicrobiana e a cicatrizante são as de mais relevado interesse no mercado clínico (JEEVITHAN et al., 2015; HAJFATHALIAN, et. al, 2018).

Partindo desse princípio, é imprescindível que o reaproveitamento dos subprodutos de peixes para a obtenção de biomoléculas sejam mais investigados com o propósito de agregar valor ao produto pesqueiro, contribuir com o desenvolvimento do Estado de Pernambuco e fornecer ao mercado matéria-prima de qualidade para futuras aplicações biológicas, a fim de beneficiar o consumidor

final. O objetivo deste trabalho foi obter enzima colagenolítica, colágeno e hidrolisado proteico a partir de resíduos de robalo-flexa (*Centropomus undecimalis*) visando a sua aplicação biotecnológica a partir da obtenção de biomoléculas, tendo em vista que o robalo-flexa é uma espécie de captura.

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 GERAL

Obter a enzima colagenolítica, colágeno e hidrolisado proteico a partir de resíduos de peixes do robalo-flexa (*Centropomus undecimalis*).

### 2.2 ESPECÍFICOS

- Extrair colagenase a partir dos resíduos de vísceras de robalo-flexa(*C. undecimalis*);
- Purificar a enzima colagenolítica usando o Sistema de Duas fases aquosas (SDFA) através de um planejamento fatorial 2<sup>4</sup>;
- Obter colágeno ácido-solúvel (ASC) e colágeno pepsino-solúvel(PSC);
- Caracterizar bioquimicamente e estruturalmente o colágeno ASC ePSC;
- Obter hidrolisado proteico a partir dos colágenos utilizando a colagenase;
- Avaliar o perfil eletroforético do colágeno e hidrolisado proteico quanto à composição de bandas e massas moleculares por SDS- PAGE.



### 3 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

#### 3.1 Piscicultura e Resíduos do Pescado

O crescimento da indústria da Pesca e Aquicultura tem sido bastante promissor para a economia mundial. De acordo com os dados fornecidos pela Organização das Nações Unidas para Agricultura e Alimentação (FAO), em 2018 o total da produção mundial da pesca capturada foi a mais alta registrada, atingindo 179 milhões de toneladas, um aumento significativo de mais de 32% em relação à média dos anos anteriores, podendo chegar a atingir mais de 190 milhões até o ano de 2026.

No Brasil, o crescimento da piscicultura tem se destacado para atender a demanda de alimentos por ser uma fonte rica em proteínas, aminoácidos e ômega-3 (OLIVEIRA *et al.*, 2017a). A partir desse princípio tem auxiliado na alimentação balanceada e saudável, para manter o bom funcionamento celular e de todos os órgãos presentes no corpo (STOHS; KITCHENS, 2019).

Levando em consideração o alto consumo desse tipo de produto, os consumidores, pescadores artesanais e a indústria pesqueira têm gerado muitos resíduos durante as etapas de processamento/beneficiamento, pois aproximadamente 70% do peso dos peixes são constituídos por resíduos, tais como: ossos, pele, escamas, barbatanas, nadadeiras e vísceras, como fígado, estômago e intestino, os quais quase sempre são descartados inadequadamente no ambiente de coleta ou lixeiras, tornando-o bastante danoso ao meio ambiente (OLIVEIRA *et al.*, 2017b; ZAMORANO-APODACA, *et al.*, 2020).

Partindo desse princípio, destaca-se o robalo-flexa (*C. undecimalis*), um peixe de alto valor e bastante apreciado pelos consumidores, devido o seu filé possuir um excelente sabor e qualidade. A espécie pertencente à família Centropomidae e à ordem Perciformes, sendo um peixe de água marinha e que também poder ser encontrado em menor abundância em ambientes de água doce (AMARAL *et al.*, 2009; CORRÊA *et al.*, 2010).

O robalo-flexa (*C. undecimalis*) (Figura 1), também conhecido popularmente por Camurim, tem sido uma das espécies muito presente na conservação de estoques naturais e na piscicultura (PEREIRA *et al.*, 2015), tornando-o uma espécie de alto valor econômico para a pesca artesanal, esportiva e industrial.

Essa espécie pode ser encontrada no Sudeste dos Estados Unidos, Flórida, podendo chegar, inclusive em vários estados do Brasil (PEREIRA et al., 2015).

Figura 1. Robalo-flexa adulto (*C.undecimalis*).

Fonte: Autor



A alimentação e os hábitos do robalo são bastante diversificados, pois depende do seu estágio de desenvolvimento. Os juvenis, por exemplo, têm preferência por crustáceos e nadam em cardumes, enquanto os adultos alimentam-se preferencialmente por peixes e crustáceos vivem mais solitários e podem nadar até 100m de profundidade (PEREIRA et al., 2015).

### 3.2 Colágeno

O colágeno é uma proteína estrutural fibrosa na matriz extracelular e insolúvel, sendo a principal estrutura dos tecidos conjuntivos, estando presente em tendões, pele, ligamentos, ossos e em diversos tipos de organismos aquáticos e terrestres (Figura 3) (ALVES et al., 2017; RIAZ et al., 2018; SUBHAN et al., 2021), sendo considerado um polímero versátil e presente nos resíduos da pesca e da aquicultura (OLIVEIRA et al., 2021).

O colágeno é formado por cadeias de polipeptídeos constituídas pela sequência repetida  $(\text{Gly-XY})_n$ , onde X e Y podem ser ocupados por qualquer aminoácido, embora essas posições sejam comumente ocupadas por prolina e hidroxiprolina (JAFARI et al., 2020). As principais fontes de colágeno que mais atendem a indústria em geral são provenientes de mamíferos, especialmente, bovinos e suínos.

Atualmente, por questões sanitárias e culturais a procura por fontes alternativas tem incentivado a busca de extraídos de organismos aquáticos ou dos resíduos provenientes de seu beneficiamento, como cabeças, peles, escamas (quando presentes), bexiga natatória e ossos/carcaça (OLIVEIRA et al., 2021).

Até momento já foram descritos pelo menos 29 subtipos de moléculas da família do colágeno, sendo o colágeno tipo I, na qual pode ser extraído de vários organismos de vida marinha como: lula, polvo, esponjas do mar, camarão (TAYEL et al., 2018). O mais abundante, encontrado na pele, escamas e ossos de peixes, e mais utilizado na indústria, muito devido suas propriedades físico-químicas, espectroscópicas e densitométricas (OLIVEIRA et al., 2021). As propriedades de cada molécula de colágeno sinalizam viabilidade e tipo de aplicação industrial (SIONKOWSKA et al., 2020).

O colágeno tem sido utilizado em inúmeras aplicações visando melhorias a saúde humana e animal, através do seu uso em processos de cicatrização, tratamento de ferimentos e queimaduras (LIMA-JÚNIOR et al., 2017; ARUMUGAM et al., 2018). Ainda, tem sido empregado na indústria alimentícia, principalmente, para a produção de gelatina (PANG et al., 2017), na indústria de couro para confecção de bolsas e sapatos, e no segmento cosmético para proteção da pele e antienvelhecimento (ALVES et al., 2017; OLIVEIRA et al., 2017b).

O método de extração (Figura 2) também pode alterar a estrutura da molécula. E levando em consideração que o tipo de estrutura definirá a função, o método de extração deve ser escolhido com critério (extração ácida, enzimática, ambas, com técnicas auxiliares, como sonicação, entre outros, por exemplo) (OLIVEIRA et al., 2021).



A estrutura do colágeno foi estudada usando várias tecnologias modernas e pode ser observada uma variação de acordo com as fontes e as estações do ano, o que pode afetar suas aplicações e condições ideais de extração. Além do valor nutricional estabelecido como fonte de proteína, colágeno e produtos derivados de colágeno podem exercer várias atividades biológicas em potencial nas células da matriz extracelular através dos peptídeos derivados de alimentos correspondentes após a ingestão, e isso pode ser favorável na aplicação de suplementos alimentares e preparações farmacêuticas.

### 3.3 Produtos obtidos a partir da hidrólise do colágeno

A partir da hidrólise parcial do colágeno podem ser obtidas fontes de gelatina que podem ser provenientes de aves, mamíferos, suíno, peixe. Algumas matérias-primas alternativas chamaram a atenção de pesquisadores e da indústria, não apenas porque superaram as preocupações religiosas compartilhadas por judeus e muçulmanos, mas também porque fornecem, em alguns casos, vantagens tecnológicas sobre as gelatinas de mamíferos (CASANOVA et al., 2020).

As peles de peixes de várias espécies estão entre as outras fontes que foram amplamente estudadas para a produção de gelatina de alta qualidade com diferentes temperaturas de fusão e gelificação em uma faixa muito mais ampla do que as gelatinas de mamíferos, mas ainda assim têm uma força e viscosidade de gel suficientemente alta (SILVA, et al., 2018; SULTANA et al., 2018).

Para ser consumida, a gelatina passa por processos de purificação para melhor uso industrial, principalmente na área de alimentos. No entanto, a aceitabilidade dos produtos de gelatina depende muito das fontes animais. As gelatinas extraídas de fontes suínas e bovinas têm características atraentes, mas aceitação limitada devido a proibições religiosas e possíveis ameaças zoonóticas, enquanto a gelatina de peixe é bem-vinda em todas as religiões e culturas (ALI et al., 2018).

### 3.5 Produção de gelatina com pele de peixe

A pele de peixe tem sido um dos principais resíduos utilizados na indústria do processamento de pescado e frutos do mar (ABDLHEDI et al., 2017; SULTANA et al., 2018). Embora alguns estudos registrem a produção de gelatina proveniente de outros tipos de resíduos, por exemplo, a escama de carpa-comum, *Cyprinus carpio* (HUANG et al., 2018), a gelatina proveniente da pele tem apresentado maior rendimento e consequentemente, é a mais aplicada para a elaboração de produtos na indústria. Através da (Tabela 1) é possível identificar a variedade de espécies aquáticas já registradas na literatura utilizadas para a extração de colágeno e produção de gelatina para fins biotecnológicos.

Tabela 1 - Espécies de peixes utilizadas para a produção de gelatina a partir de resíduos de pele.

<b>Espécie</b>	<b>Autor</b>
<i>Oreochromis niloticus</i>	Zhang et al.(2016)
<i>Ictalurus punctatus</i>	Zhang et al. (2016)
<i>Liza aurata</i>	Bkhairia et al. (2016)
<i>Anguilla anguilla</i>	Sila et al. (2017)
<i>Hemiramphus far</i>	Abdelhedi et al. (2017)
<i>Ctenopharyngodon idellus</i>	Cai et al. (2017)
<i>Hypophthalmichthys nobilis</i>	Huang et al. (2017)
<i>Oncorhynchus mykiss</i>	Cheunget al. (2017)
<i>Probarbus jullieni</i>	Ali et al. (2018)
<i>Cyprinus carpio</i>	Santos et al. (2018)
<i>Brycon amazonicus</i>	Silva et al. (2018)
<i>Colossoma macroponum</i>	Silva et al. (2018)
<i>Katsuwonus pelamis</i>	AksunTümerkan et al. (2019)
<i>Aluterus monoceros</i>	Renukaetal. (2019)
<i>Epinephelus diacanthus</i>	Renuka et al. (2019)

<i>Salmo salar</i>	Pępczyńska et al. (2019)
<i>Oreochromis aureus</i>	Sow et al. (2019)
<i>Pollachius virens</i>	Casanova et al. (2020)
<i>Oreochromis mossambicus</i>	Tan et al. (2020)

---

Fonte: Autor

### 3.5 Peptídeos de colágeno de peixe

Os peptídeos derivados do colágeno de origem aquática servem como antioxidantes. A atividade de eliminação de radicais é devida principalmente à alta presença de prolina (Pro) e glicina (Gly) dentro de sua sequência de aminoácidos que desempenham um importante papel na doação de prótons a radicais deficientes em elétrons (SUN et al., 2017).

Estudos em humanos e animais demonstraram e sugerem que a ingestão de peptídeos de colágeno de baixo peso molecular (geralmente, entre 2 kDa e 6 kDa) pode melhorar as condições subjetivas e objetivas da pele e atenuar os danos induzidos pela radiação UV na pele (LÉON-LÓPEZ, et al., 2019).

A eficácia dos peptídeos de colágeno depende do histórico dos sujeitos e das condições ambientais. Vários estudos *in vitro* demonstraram que o peptídeo Pro-Hyp exerce atividades biológicas significativas em fibroblastos e queratinócitos. Estes efeitos podem estar associados ao benefício efeitos causados pela ingestão de peptídeos de colágeno. Os efeitos do Pro-Hyp nos fibroblastos que migram da pele são diferentes daqueles sobre os fibroblastos em linhas celulares (BENAYAHU et al., 2018; SATO et al., 2018).

A capacidade dos peptídeos para resistir em várias condições gastrointestinais e térmicas pode ser útil para a sua aplicação como ingrediente (SINGH e VIJ, 2018). Alguns peptídeos podem influenciar funções cerebrais superiores, como ingredientes para o desenvolvimento de alimentos funcionais e

aplicações nutraceuticas (aprendizado e memória, em humanos e animais. Os dipeptídeos e tripeptídeos podem atravessar a parede intestinal e entrar diretamente na corrente sanguínea, podendo atingir os órgãos-alvo para exercer os seus efeitos neuroprotetores (XU et al., 2015).

A hipertensão é um distúrbio resultante de uma interação de fatores genéticos e ambientais e é reconhecido como um alvo-chave para controlar a mortalidade relacionada à doença cardiovascular. A enzima conversora da angiotensina (ACE) é uma metaloprotease de zinco ligada à membrana que catalisa a clivagem proteolítica de um dipéptido do terminal carboxilo em Angiotensina-I para formar angiotensina-II (GIORDANO et al., 2018). Os efeitos desses peptídeos bioativos são devidos principalmente à inibição da enzima conversora da angiotensina I (ECA) no sistema renina-angiotensina aldosterona.

Os medicamentos inibidores da ECA, como captopril, lisinopril e o enalapril, comprovadamente bem sucedidos no tratamento da hipertensão. Entretanto, o uso de drogas anti-hipertensivas sintéticas está associado a vários efeitos colaterais, como secura, tosse, irritação da pele, angioedema e dor de cabeça. Os peptídeos inibidores da ECA mais potentes contêm Hyp-GlyPro, já tendo sido obtidos da hidrólise de colágeno proveniente de organismos aquáticos, representando uma alternativa aos anti-hipertensivos (FELICIAN et al., 2018).

Os problemas crescentes da resistência múltipla a bactérias, os riscos potenciais para a saúde de antimicrobianos e conservantes químicos para alimentos levou a uma busca por fontes baseadas na natureza para a produção de peptídeos antimicrobianos. Sendo os organismos aquáticos uma das fontes alternativas, os peptídeos antimicrobianos (AMPs) foram isolados e caracterizados a partir de peixes e várias espécies de invertebrados marinhos, incluindo esponjas, cnidários, artrópodes e moluscos (OLIVEIRA, et al., 2021). Peptídeos com função antimicrobiana oriundos de organismos aquáticos constituem uma nova geração de antibióticos, tendo sido relatado ação contra Bactérias Gram-negativas e Gram-positivas (ZAMORANO-APODACA et al., 2020).

Esses peptídeos possuem porções catiônicas, que facilitam sua interação com membranas de patógenos microbianos (FELICIAN et al., 2018). Outra função biológica importante desses peptídeos é de poderem ser utilizados para satisfazer



necessidades biomédicas especiais, incluindo sensibilidade de certas enzimas superexpressas em microambientes tumorais, ligação seletiva a células tumorais desejadas, melhorar a eficiência de penetração da membrana celular e até regulação da apoptose de células tumorais (BECHMANN et al., 2018; JACOB et al., 2018; RONG et al., 2018).

Com base no contexto mencionado acima, os procedimentos para a produção de peptídeos biologicamente ativos podem ser amplamente classificados em dois grupos: (i) peptídeos naturalmente ativos que podem ser diretamente extraídos de fontes marinhas; (ii) peptídeos que podem ser obtidos a partir da hidrólise de proteases de organismos marinhos com a utilização de uma variedade de enzimas digestivas, por exemplo, collagenase (GIORDANO et al., 2018).

### 3.6 Resíduos do pescado como fonte de enzimas de interesse biotecnológico

As enzimas atuam como catalisadores biológicos no metabolismo (TRINCONI, 2011), assumindo papel fundamental nos processos de digestão de macromoléculas e na regulação de várias reações químicas, além de outras funções do organismo. As espécies de peixes são fontes ricas em conteúdo enzimático, sobretudo de proteases (enzimas que atuam clivando proteínas provenientes da dieta), ácidas (pepsina, por exemplo) e alcalinas (tripsina, quimotripsina, fibrinolítica, collagenase, por exemplo (GURUMALLESH et al., 2019; SILVA et al., 2019).

Devido suas propriedades físico-químicas, como: temperatura, pH, termoestabilidade, entre outras, as enzimas de peixes acabam ocupando uma parcela significativa no mercado global de enzimas, sendo matéria-prima para várias aplicações biotecnológicas: têxtil, produção de couro, detergente, biomédica, terapêutica, entre outros (OLIVEIRA et al., 2017), como descrito na Tabela 2.


Tabela 2 - Aplicações biotecnológicas das principais enzimas de peixes utilizadas na indústria


Nome científico	Nome vulgar	Enzima	Aplicação	Autor
<i>Coryphaena hippurus</i>	Dourado	Tripsina	Componente para produção de detergente	Santos <i>et al.</i> (2020)
<i>Thunnusalalunga</i>	Albacora	Tripsina	Componente para produção de detergente	Poosin <i>etal.</i> (2019)
<i>Thunnusalalunga</i>	Albacora	Tripsina	Extração de carateno proteína	Poosin <i>etal.</i> (2019)
<i>Cynoscion leiarchus</i>	Pescada branca	Colagenase	Produção de peptídeos de colágeno	Oliveira <i>etal.</i> (2019)

Os resultados dessa tese estão apresentados na forma de artigos, O artigo **“Extraction of collagenolytic enzyme from fish viscera by phase partitioning (peg/citrato) and its potential for industrial application\*”** foi publicado no periódico Boletim do Instituto de Pesca, volume 46, artigo 4 ou p. 01-08, 2020, ISSN: 1678-2305, link para acesso:


<https://doi.org/10.20950/1678-2305.2020.46.4.593>


## EXTRACTION OF COLLAGENOLYTIC ENZYME FROM FISH VISCERA BY PHASE PARTITIONING (PEG/CITRATE) AND ITS POTENTIAL FOR INDUSTRIAL APPLICATION\*


Jessica Costa SILVA<sup>1</sup> 

Luiz Henrique Svintiskas LINO<sup>1</sup> 

Márcia Nieves CARNEIRO DA CUNHA<sup>1</sup> 

Juanize Matias da Silva BATISTA<sup>1</sup> 

Vagne Melo OLIVEIRA<sup>1\*</sup> 

Ana Lúcia Figueiredo PORTO<sup>1\*</sup> 

<sup>1</sup> Universidade Federal Rural de Pernambuco - UFRPE, Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal - DMFA, Laboratório de Tecnologia de Produtos Bioativos - LABTECBIO. Av. Dom Manoel de Medeiros, s/n, CEP: 52.171-900, Recife, PE, Brazil. vagne\_melo@hotmail.com; analuporto@yahoo.com.br (\*corresponding authors).

### ABSTRACT

Internal viscera fish are potential sources of protein biomolecules of biopharmaceutical interest. However, this residue is frequently discarded inappropriately. The possibility to obtain byproducts of higher added value is a reality. Inside this view attention must be given to processes for the recovery and extraction of target molecules. However, the high cost of processing these residues is one of the obstacles to their reuse; techniques that facilitate their handling and make the process cheaper are desirable, such as extraction in a two-phase aqueous system. Thus, the aim of this study was to extract collagenolytic enzymes from common snook (*Centropomus undecimalis*) using a two-phase aqueous system (polyethylene glycol/citrate), according to the 2<sup>4</sup> factorial design, using as variables: molar mass of PEG ( $M_{PEG}$ ), PEG concentration ( $C_{PEG}$ ), citrate concentration ( $C_{CIT}$ ), pH, still, considering purification factor (PF), partition coefficient (K), and yield (Y). The collagenolytic activity of the crude extract was 102.41 U mg<sup>-1</sup>, after partitioning, was purified 3.91 times ( $M_{PEG}$ : 8000;  $C_{PEG}$ : 20.0%;  $C_{CIT}$ : 20.0% and pH 6.0). Inhibition (U mg<sup>-1</sup>) was observed in benzamidine (22.51), TLCK (21.05), TPCK (21.29), and PMSF (23.05), signaling to be a serine-protease. The results showed the advantage of this semipurification technique as concerns to the low cost of extraction and purification, adding value to the fishing source material and allocating the residues from its processing to the industry.

**Keywords:** biotechnology; collagenase; by-products; residue.

### EXTRAÇÃO DE ENZIMA COLAGENOLÍTICA DAS VÍSCERAS DE PEIXES POR PARTIÇÃO DE FASES (PEG/CITRATO) E SEU POTENCIAL PARA APLICAÇÃO INDUSTRIAL

### RESUMO

Vísceras internas de peixes são fontes potenciais de biomoléculas proteicas de interesse biofarmacêutico. No entanto, esse resíduo é frequentemente descartado de forma inadequada. A possibilidade de obtenção de subprodutos de maior valor agregado é uma realidade. Dentro desta visão, atenção deve ser dada aos processos de recuperação e extração de moléculas-alvo. Como o alto custo do processamento desses resíduos é um dos obstáculos para sua reutilização, técnicas que facilitem seu manuseio e barateiem o processo são desejáveis, como a extração em sistema bifásico. Assim, o objetivo deste estudo foi extrair enzimas colagenolíticas de robalo-flecha (*Centropomus undecimalis*) usando sistema bifásico (polietilenoglicol/citrato), de acordo com o planejamento fatorial 2<sup>4</sup>, tendo como variáveis: massa molar do PEG ( $M_{PEG}$ ), concentração de PEG ( $C_{PEG}$ ), concentração de citrato ( $C_{CIT}$ ), e pH; ainda, considerando: fator de purificação (PF), coeficiente de partição (K) e rendimento (Y) como respostas. A atividade colagenolítica do extrato bruto foi de 102,41 U mg<sup>-1</sup>. Após o particionamento, a amostra foi purificada 3,91 vezes ( $M_{PEG}$ : 8000;  $C_{PEG}$ : 20,0%;  $C_{CIT}$ : 20,0% e pH 6,0), sendo inibida (U mg<sup>-1</sup>) pela benzamidina (22,51), TLCK (21,05), TPCK (21,29), e PMSF (23,08), sinalizando tratar-se de uma serino-protease. Os resultados mostraram a vantagem desta técnica de semipurificação no que diz respeito ao baixo custo de extração e purificação, valorizando a matéria-prima pesqueira e destinando os resíduos de seu processamento para a indústria.

**Palavras-chave:** biotecnologia; colagenase; subprodutos; resíduo.

\*This study was financed in part by the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Finance Code 1 (Processo nº 8888.119817/2016-01). This study is part of Jessica Costa Silva master's dissertation, which is deposited in its entirety in UFPE's digital repository.

Received: June 15, 2020

Approved: December 11, 2020



## INTRODUCTION

The need for reuse of waste is a practice that has been increasingly encouraged, especially organic solids, such as those from the fishing industry. During the processing of fish there is a lot of organic matter that is produced, among them: head, tail, fins, skin, scales and internal viscera (stomach, intestine, pyloric caecum, mesentery, among others), most of these materials are discarded. Special attention must be given to proteic macromolecules of that have high biotechnological interest. Recently, fishing waste has been the subject of research on their applications in human and animal health (Ideia et al., 2020; Oliveira et al., 2020).

From digestive viscera of aquatic organisms, it is possible to extract various proteases (pepsin, trypsin, chymotrypsin and collagenases and/or enzymes with similar catalytic functions) (Oliveira et al., 2017a; Gurumalles et al., 2019; Silva et al., 2019). Enzymes with collagenolytic properties of aquatic organisms have already been recovered and partially purified from digestive residues of Neotropical fish species (Silva et al., 2019; Oliveira et al., 2017b; Liu et al., 2019). The collagenolytic property (collagen cleavage) is quite required in industry, mainly biomedical and pharmaceutical, being applied in surgical procedures (Zhao et al., 2019), intracerebral therapies (Chen-Roetling et al., 2019), wound healing (Aboud et al., 2018), extraction of collagen and production of bioactive peptides (Bhagwat and Dandge, 2018), fibrosis treatment (Villegas et al., 2018), and treatment of Dupuytren (Zhang et al., 2019), thus making these enzymes fall into the category of high commercial value proteases (Oliveira et al., 2017c).

Various methods of separating protein biomolecules for biopharmaceutical use have been used to obtain collagenolytic enzymes with a higher degree of purity, the main ones being chromatographic (ion exchange, molecular exclusion) (Kim et al., 2002; Park et al., 2002). However, the high cost of obtaining it makes it necessary and desirable to constantly search for alternative sources and for extraction processes that are fast, efficient and low cost, such as liquid-liquid extraction, using the aqueous two-phase system (ATPS) (Oliveira et al., 2020). ATPS is a form of partitioning where the system is formed by two distinct phases employing a polymer (usually, polyethylene glycol, PEG) and a salt (citrate, sulfate, phosphate, for example). In aquaculture, the extraction by ATPS has been successful in the recovery of microalgae products (Phong et al., 2018; Suarez Garcia et al., 2018), mainly ribulose-1,5-biphosphate carboxylase/oxygenase (Suarez Ruiz et al., 2018), proteases from hepatopancreas of pacific white shrimp (Senphan and Benjakul, 2014), and alkaline proteases from albacore tuna (*Thunnus alalunga*) liver (Sripokar et al., 2017) and spleen (Poonsin et al., 2017), and intestine from peacock bass (*Cichla ocellaris*) (Oliveira et al., 2020). Thus, this study aimed to partition a collagenolytic protein from digestive waste of common snook (*Centropomus undecimalis*), using two-phase aqueous system (PEG/citrate) for future biotechnological applications.

## MATERIAL AND METHODS

### Materials

Azocoll substrate, Tris, polyethylene glycol (PEG) of 400, 3350 and 8000 molar mass, dehydrate tri-sodium citrate and monohydrate citric acid salts used were obtained from Sigma-Aldrich®, Saint Louis, USA. HCl-Merck, Darmstadt, Germany. All other reagents were used of analytical grade.

### Extraction of collagenolytic enzyme

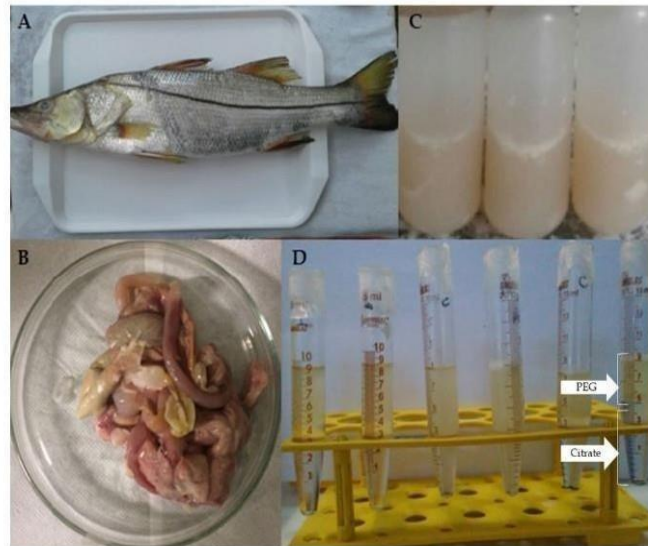
Digestive viscera of common snook (Brazilian Genetic Heritage n°A25441A) were collected from fish sellers in the public market of São José, Recife, Pernambuco, Brazil. The viscera were transported under refrigeration in ice bags to the Bioactive Technology Laboratory, LABTECBIO, Federal Rural University of Pernambuco, UFRPE. The enzymatic extraction was done by the description by Oliveira et al. (2019). Primarily, 30 g of intestinal viscera were macerated in 50 mM Tris-HCl extraction buffer, homogenized (IKA RW 20D S32, Guangzhou, China) for 5 min., at 10,000-12,000 rpm (4°C), and centrifuged at 12,000 x g (Sorvall® Superspeed RC-6 Centrifuge, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) for 30 min. at 4°C. The resulting supernatant was preheated to 55°C for 30 min., was centrifuged again. The resulting supernatant was called crude enzyme extract, used in later analyzes, as shown in Figure 1. The common snook (*Centropomus undecimalis*) crude extract was subjected to ATPS PEG/citrate technique to extract and pre purify of collagenolytic protease (Figure 1).

### Protein determination

The protein concentrations of all samples were determined by the method of bicinchoninic acid (BCA) according to Smith et al. (1985).

### Extraction of aqueous two-phase systems (ATPS)

For enzyme extraction, the ATPS runs were formed in different concentrations according to the 2<sup>4</sup>-factorial design, described in Table 1. The solution of sodium citrate (30% w w<sup>-1</sup>) was prepared by mixing solutions of dihydrate tri-sodium citrate and monohydrate citric acid to obtain pH values (6.0, 7.0 and 8.0) and different volumes of these solutions were transferred to 15 mL-graduated tubes containing different PEG concentrations with different molar masses (400, 3350 or 8000 g mol<sup>-1</sup>). This mixture was added the crude extract accounting for 20% (w w<sup>-1</sup>) of total mass and after water addition up to a final mass of 5 g, the suspensions were then homogenized in a vortex for 1 min., and the two phases were separated by settling for 1 h. The influence of independents variables poly(ethylene glycol) molecular mass ( $M_{PEG}$ ), PEG concentration ( $C_{PEG}$ ), sodium citrate concentration ( $C_{cit}$ ), and pH, was verify under the response variables protease collagenolytic partition (K), yield (Y) and purification factor (PF) according to a 2<sup>4</sup>-factorial complete design, composed of 16 runs; all independent variables were evaluated at two levels (+1 and -1) (Table 1), with three replicates at the central point (0)



**Figure 1.** Biphasic system extraction of proteases from common snook (*Centropomus undecimalis*). A - Exemplary of *C. undecimalis*; B - Digestive viscera; C - Crude enzymatic extract; D - ATPS system with intestinal extract.

**Table 1.** Factors levels and variables used in the  $2^4$ -factorial design selected for protease collagenolytic extraction by the PEG/Citrate ATPS.

Variable	Levels		
	Low (-1)	Central (0)	High (+1)
$M_{PEG}$ (g mol <sup>-1</sup> )	400	3350	8000
$C_{PEG}$ (%w w <sup>-1</sup> )	20.0	22.0	24.0
$C_{CIT}$ (%w w <sup>-1</sup> )	15.0	17.5	20.0
pH	6.0	7.0	8.0

$M_{PEG}$  = PEG molar mass;  $C_{PEG}$  = PEG concentration;  $C_{CIT}$  = Citrate concentration

used to estimate the experimental error as described by (Barros-Neto et al., 2003). After the experiments, the statistical analysis of the data was performed using the Statistica 8.0 program (Statsoft Inc., 2008).

#### Determination of ATPS parameters

The protease collagenolytic partition coefficient (K) was determined as the ratio of collagenolytic activity (U mL<sup>-1</sup>) in the PEG-rich top phase (CA<sub>t</sub>) to that in the salt-rich bottom phase (CAB):  $K = CA_t / CA_B$ .

The yield (Y) was determined as the ratio of the total collagenolytic activity in the top phase to that in the crude extract and expressed as a percentage:  $Y = (CA_t \times V_t / CA_{ce} \times V_{ce}) \times 100$ ; where,  $V_t$  and  $V_{ce}$  are the volumes of the top phase and the crude extract, respectively.

The purification factor (PF) was defined as the ratio of the specific activity in the top phase to its initial value in the crude

extract before partition:  $PF = (CA_t / Pt) / (CA_{ce} / Pt_{ce})$ ; where Pt (protein in phase rich PEG) and  $Pt_{ce}$  (protein in crude extract) are the total protein concentrations (mg mL<sup>-1</sup>) and  $CA_t$  (collagenolytic in phase rich PEG) and  $CA_{ce}$  (collagenolytic in crude extract) are collagenolytic activities (U mL<sup>-1</sup>).

#### Collagenolytic assay

Collagenolytic activity was performed according to Oliveira et al. (2020). First, in microtube (2 mL), 5 mg of the azocoll, 500 µL of 50 mM Tris-HCl (pH 7.5) and 500 µL of enzymatic sample were added, incubated at 55°C for 30 min., under constant agitation. Then, the reaction was stopped (200 µL of 40% trichloroacetic acid, TCA) for 10 min., to then be centrifuged (10,000 x g for 10 min at 4°C). The reading was done at 520 nm. All tests were performed in triplicate.

#### Inhibitor sensitivity

The evaluation of sensitivity to inhibitors was carried out according to Oliveira et al. (2019). Briefly: in Eppendorf (2 mL), in the proportion of 1:1, the partitioned sample was subjected to Benzamidine, ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA), Phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF), Tosyl-L-lysine chloromethyl ketone (TLCK), Tosyl phenylalanone chloromethyl ketone (TPCK), for a period of 30 min., to then determine the collagenolytic activity (U mg<sup>-1</sup>). Data are expressed as mean ± SD. These data were statistically analyzed by ANOVA, followed by a post hoc (Tukey) test, when indicated. Differences between groups were accepted as significant at the 95% confidence level ( $p < 0.05$ ).



## RESULTS

The two phases formation of intestine extracts was not observed in runs 1, 3, 9 and 11 after the addition of the crude extract in the system (Table 2). The results obtained of partition coefficient (K) indicating that the collagenolytic protease has higher affinity for the upper phase of the system (rich in PEG), since  $K > 1$  values were obtained. It was observed that only in tests 5 and 7 the enzyme partitioned for lower phase of the system.

The effect of independent variables and their interactions evaluated of factorial design showed that K was positively influenced by the PEG molar mass ( $M_{PEG}$ ) (Table 3).

In the runs formed by the polymer with molar mass  $8.000 \text{ g mol}^{-1}$  higher values of partition coefficient were obtained (13.17 and 14.78), indicating once again the affinity of the collagenolytic protease for the upper phase of system (rich in PEG). The interaction between the  $M_{PEG}$  and pH (1X4) had a significant negative effect under the K for  $p < 0.05$ .

This interaction presented the antagonistic effect since a lower pH value combined with the higher polymer molar mass

( $8000 \text{ g mol}^{-1}$ ) favored the enzymatic partition for the polymeric phase. For the activity Yield (Y) values above 100% were observed in the upper phase of the system in the extraction of the collagenolytic protease from *C. undecimalis* (Table 2). As well as, in the statistical analysis of K, it was possible to observe a strong significant positive influence of  $M_{PEG}$  under Y in the upper phase ( $Y_{PEG}$ ) and the negative influence of the interaction between  $M_{PEG}$  and pH (1x4) for  $p < 0.05$  (Table 3).

The highest purification factors (PF) 3.91 was obtained on the run 6, formed with PEG molar mass  $8000 \text{ (g mol}^{-1})$  in 20.0% (w w<sup>-1</sup>) concentration, 20% (w w<sup>-1</sup>) of citrate concentration at pH 6.0 (Figure 2). Just like for K and Y activity, the independent variable  $M_{PEG}$  also had the strong significant positive effect on PF, already, the polymer concentration had a significant negative effect for this variable response. The interaction between variables the  $M_{PEG}$ ,  $C_{PEG}$  and pH (1x2x4) was positively significant ( $p < 0.05$ ) for obtaining for this variable (Table 3).

In the investigation of sensitivity to inhibitors, the common snook collagenolytic enzyme partitioned by the ATPS system showed reduced activity when exposed, in decreasing order (%): PMSF ( $23.08 \pm 0.00^b$ ), benzamidine ( $22.51 \pm 0.02^b$ ), TPCK ( $21.29 \pm 0.02^b$ ), and TLCK ( $21.05 \pm 0.01^b$ ), all tests being statistically significant.

**Table 2.** Matrix of the full factorial design ( $2^4$ ) with conditions and results of the collagenolytic protease partition.

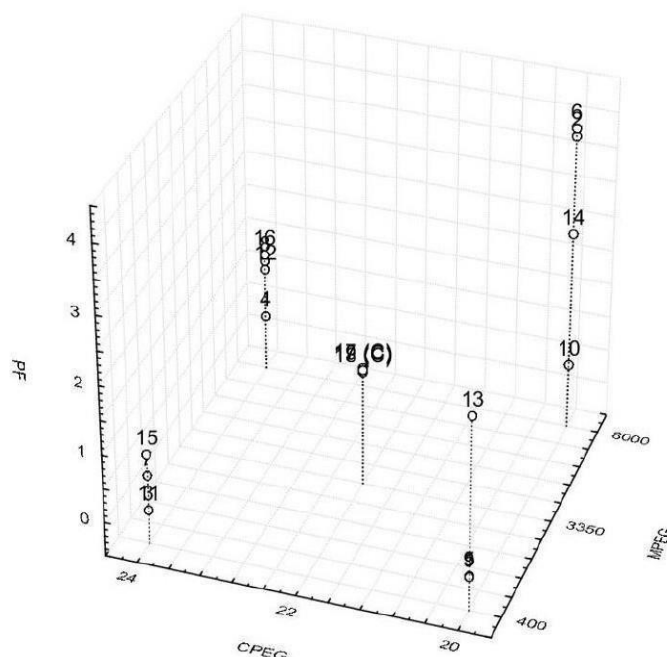
Ensaio	$M_{PEG}$ (g mol <sup>-1</sup> )	$C_{PEG}$ (%)	$C_{CTT}$ (%)	pH	K	$Y_{PEG}$ (%)	PF
1	400	20	15	6	***	***	***
2	8000	20	15	6	9.39	236.24	3.80
3	400	24	15	6	***	***	***
4	8000	24	15	6	13.17	220.07	0.30
5	400	20	20	6	0.63	20.04	0.01
6	8000	20	20	6	14.78	326.52	3.91
7	400	24	20	6	0.81	53.01	0.51
8	8000	24	20	6	4.17	120.98	1.15
9	400	20	15	8	***	***	***
10	8000	20	15	8	2.43	94.98	0.44
11	400	24	15	8	***	***	***
12	8000	24	15	8	3.56	110.75	1.02
13	400	20	20	8	10.95	207.51	2.32
14	8000	20	20	8	3.30	146.10	2.39
15	400	24	20	8	1.16	34.34	0.83
16	8000	24	20	8	6.24	123.52	1.24
17 (C)	3350	22	17.5	7	8.43	164.26	1.23
18 (C)	3350	22	17.5	7	9.39	200.07	1.18
19 (C)	3350	22	17.5	7	7.78	179.65	1.20

$M_{PEG}$  = PEG molar mass;  $C_{PEG}$  = PEG concentration;  $C_{CTT}$  = Citrate concentration; K = Partition coefficient; Y = Yield; PF = Purification factor; \*\*\*No phase formation after addition of extract. (C) = Central point.

**Table 3.** Statistical analysis for the responses of collagenolytic protease by PEG-Citrate ATPS performed according to the  $2^4$  experimental design.

Variables	K	$Y_{PEG}$	PF
(1) $M_{PEG}$	13.41*	14.80*	91.51*
(2) $C_{PEG}$	-3.80	-5.13*	-67.54*
(3) $C_{CTT}$	4.16	5.14*	59.01*
(4) pH	-4.72*	-3.61	-12.40*
1x2	2.11	-1.22	-50.49*
1x3	-4.19	-3.61	-4.75*
1x4	-11.29*	-8.31*	-57.76*
2x3	-6.84*	-5.11*	-17.09*
2x4	0.29	0.12	31.95*
3x4	5.49*	3.36	33.22*
1x2x3	-0.91	-1.21	-0.04
1x2x4	6.42	5.85*	66.41*
1x3x4	-1.08	-1.33	-12.14*
2x3x4	1.92	-0.76	-38.59*

K = Partition coefficient; Y = Activity yield; PF = Purification factor;  $M_{PEG}$  = PEG molar mass;  $C_{PEG}$  = PEG concentration;  $C_{CTT}$  = Phosphate concentration; \*Statistically significant  $p < 0.05$ .



**Figure 2.** Scatter plot graphic of the simultaneous effects of PEG molar mass ( $M_{PEG}$ ) and PEG concentration ( $C_{PEG}$ ) on the Purification Factor (PF) in the top phase to extraction of collagenolytic protease from *C. undecimalis* using factorial design  $2^4$  by aqueous two-phase systems.

## DISCUSSION

The common snook has been identified as a promising species for supplying enzymes, such as trypsin, chymotrypsin (Concha-Frias et al., 2016), leucine aminopeptidase, carboxypeptidase A, lipase,  $\alpha$ -amylase, acid phosphatases, alkaline phosphatase (Jimenez-Martinez et al., 2012), and collagenases (Silva et al., 2019). The richness in proteases of the sea bass intestinal viscera has aroused interest for investigations that may lead to the reuse of its residues and at the same time provide alternative sources of biomolecules. Silva et al. (2019) extracted protease from common snook intestinal viscera using only maceration and centrifugation techniques. Here, the aqueous two-phase system (ATPS) was chosen due to the efficiency in the extraction of collagenolytic proteases described for waste from fishery resources, mainly in the efficient extraction of proteases (Kuepethkaew et al., 2017; Phong et al., 2018; Poonsin et al., 2017; Sripokar et al., 2017; Suarez Garcia et al., 2018; Suarez Ruiz et al., 2018; Oliveira et al., 2020).

ATPS was a fast method for extracting proteases of digestive viscera from common snook, corroborating with what was described by Porto et al. (2007) and Amaral et al. (2020) when they submitted proteases to the same partitioning conditions, observing the non-formation of phases when displacement of salt and polymer concentrations were below the binodal curve

for PEG 400 g mol<sup>-1</sup>. The PEG phase potentialized the enzymatic activity, meeting that described by Oliveira et al. (2020) in which the elimination of inhibitors from the enzymatic extract of peacock bass is reported, favoring the increase in collagenolytic activity (pH 8.0; 12.5% PEG 8000 g mol<sup>-1</sup>; 10.0% phosphate).

Kuepethkaew et al. (2017) reported partitioning using ATPS (25% PEG 1000 g mol<sup>-1</sup>; 15% MgSO<sub>4</sub>; pH 5.0) as an efficient recovery technique with good yield and high degree of purification; while Ketnawa et al. (2013) reported an increase in yield (365.53%) when performing a second ATPS cycle (15% PEG 2000 g mol<sup>-1</sup>; 15% sodium citrate; pH 8.5) in digestive viscera extracts of giant catfish (*Pangasianodon gigas*) for partitioning alkaline proteases, indicating that ATPS can be expanded to industrial production.

The statistical analysis of results showed that the independent variable  $M_{PEG}$  had a strong influence for all the variables evaluated in the present study ( $K$ ,  $Y_{PEG}$  and PF).  $M_{PEG}$  had a positive influence indicating that the higher molar mass of the polymer (8000 g mol<sup>-1</sup>) favored the enzymatic partition for the upper phase of the ATPS, improved  $Y$  activity, and increased the purification factor.

Generally, with the increase in molar mass and concentration of polymer, occurs the  $K$  values decreasing. This phenomenon is known as the volume exclusion effect, since, the available free volume is reduced for the protein in the PEG-rich phase, leading



to the partition of the biomolecules to the lower phase of the system (Iqbal et al., 2016; Nadar et al., 2017).

However, as increase in the polymer molar mass occurs simultaneous increases in your hydrophobicity, due to increase in hydrophobic area to hydrophilic group ratio (Leong et al., 2015) which results in an increase in the number of hydrophobic interactions formed between the protein and the polymer molecules. Collagenolytic proteases have hydrophobic regions that favor their interaction with PEG and their partitioning to the upper phase (PEG-phase) of the system. Others authors report this behavior when studying the partitioning of these enzymes in ATPS formed by PEG-salt (Rosso et al., 2012; Oliveira et al., 2020).

After the partitioning step, the samples were submitted to sensitivity to inhibitors. The extracts of the common snook (*C. undecimalis*) showed a marked reduction in activity when subjected to classical inhibitors of serine proteases, mainly trypsin and chymotrypsin, presenting a significant difference in all treatments ( $p < 0.05$ ). Similar inhibition results by Benzamidine, TLCK, and PMSF were found for the pre-purified collagenolytic enzyme from smooth weakfish (*Cynoscion leiarchus*) (Oliveira et al., 2017a). Enzymes belonging to the class of metalloproteases activities are significantly reduced after exposure to EDTA. In a parallel, the correlation of the effects of the inhibitors on the enzymatic action can indicate the class of the target enzyme.

According to the results described herein, it is likely that the purified enzyme in question is of the serine protease class, corroborating with those described by Ternel and Simpson (1995), Roy et al. (1996), Kim et al. (2002), Park et al. (2002), Wu et al. (2010), Souchet and Laplante (2011), Sriket et al. (2011), Oliveira et al. (2017a), Silva et al. (2019), and Oliveira et al. (2020) for collagenolytic serine proteases extracted from fishing resources, such as winter flounder (*Pseudopleuronectes americanus*), shore Crab (*Carcinus maenas*), Filefish (*Novodon modestus*), Mackerel (*Scomber japonicus*), red sea bream (*Pagrus major*), Snow Crab (*Chionoecetes opilio*), fresh water prawn (*Macrobrachium rosenbergii*), Smooth weakfish (*C. leiarchus*), Bluefish (*Pomatomus saltatrix*), and peacock bass (*Cichla ocellaris*), respectively.

## CONCLUSIONS

In this study, collagenolytic protease was successfully extracted and semi purified from internal viscera from common snook using the biphasic partition method. Because it is a fast and simple technique when compared to the most improved chromatographic methods, it was possible to prove its feasibility for large-scale application in fish farming residues. All intestinal waste was reused, suggesting that this practice can be included in management plans to reduce environmental impact. The salt used (citrate) is not considered a polluting element and the polymer used can also be reused, which would reduce processing costs. The partitioned enzyme was recovered with a high degree of purification similar to the collagenolytic serine-proteases extracted using chromatographic techniques. Thus, the use of fish residues as a promising raw material in the supply of collagenolytic proteases for biopharmaceutical

applications is suggestive, mainly to compose formulations of healing ointments.

## ACKNOWLEDGEMENTS

This study was financed in part by the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Finance Code 1 (Process nº 8888.119817/2016-01).

## REFERENCES

- Abood, A.; Salman, A.M.M.; Abdelfattah, A.M.; El-Hakim, A.E.; Abdel-Aty, A.M.; Hashem, A.M. 2018. Purification and characterization of a new thermophilic collagenase from *Nocardioptis dassonvillei* NRC2aza and its application in wound healing. International Journal of Biological Macromolecules, 116: 801-810. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2018.05.030>.
- Amaral, Y.M.S.; Silva, O.S.; Oliveira, R.L.; Porto, T.S. 2020. Production, extraction, and thermodynamics protease partitioning from *Aspergillus tamarii* Kita UCP1279 using PEG/sodium citrate aqueous two-phase systems. Preparative Biochemistry & Biotechnology, 50(6): 619-626. <http://dx.doi.org/10.1080/10826068.2020.1721535>.
- Barros Neto, B.; Scarmínio, I.S.; Bruns, R.E. 2003. Como fazer experimentos: pesquisa e desenvolvimento na ciência e na indústria. 2ª. ed. Campinas: Unicamp. 401p.
- Bhagwat, P.; Dandge, P. 2018. Collagen and collagenolytic proteases: A review. Biocatalysis and Agricultural Biotechnology, 15: 43-55. <http://dx.doi.org/10.1016/j.bcab.2018.05.005>.
- Chen-Roetling, J.; Cao, Y.; Peng, D.; Regan, R.F. 2019. Rapid loss of perihematomal cell viability in the collagenase intracerebral hemorrhage model. Brain Research, 1711: 91-96. <http://dx.doi.org/10.1016/j.brainres.2019.01.014>.
- Concha-Frias, B.B.; Alvarez-González, C.A.; Gaxiola-Cortes, M.G.; Silva-Arancibia, A.E.; Toledo-Agüero, P.H.; Martínez-García, R.; Camarillo-Coop, S.; Jimenez-Martinez, L.D.; Arias-Moscote, J.L. 2016. Partial characterization of digestive proteases in the Common snook *Centropomus undecimalis*. International Journal of Biology, 8(4): 1-11. <http://dx.doi.org/10.5539/ijb.v8n4p1>.
- Gurumalles, P.; Alagu, K.; Ramakrishnan, B.; Muthusamy, S. 2019. A systematic reconsideration on proteases. International Journal of Biological Macromolecules, 128: 254-256. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2019.01.081>.
- Ideia, P.; Pinto, J.; Ferreira, R.; Figueiredo, L.; Spínola, V.; Castilho, P.C. 2020. fish processing industry residues: a review of valuable products extraction and characterization methods. Waste and Biomass Valorization, 11: 3223-3246. <http://dx.doi.org/10.1007/s12649-019-00739-1>.
- Iqbal, M.; Tao, Y.; Xie, S.; Zhu, Y.; Chen, D.; Wang, X.; Huang, L.; Peng, D.; Sattar, A.; Shabbir, M.A.B.; Hussain, H.I.; Ahmed, S.; Yuan, Z. 2016. Aqueous two-phase system (ATPS): An overview and advances in its applications. Biological Procedures Online, 18: 1-18. <http://dx.doi.org/10.1186/s12575-016-0048-8>.

- Jimenez-Martinez, L.D.; Alvarez-González, C.A.; Tovar-Ramírez, D.; Gaxiola, G.; Sanchez-Zamora, A.; Moyano, F.J.; Alarcón, F.J.; Marquez-Couturier, G.; Gisbert, E.; Contreras-Sánchez, W.M.; Perales-García, N.; Arias-Rodríguez, L.; Indy, J.R.; Páramo-Delgadillo, S.; Palomino-Albarán, I.G. 2012. Digestive enzyme activities during early ontogeny in Common snook (*Centropomus undecimalis*). *Fish Physiology and Biochemistry*, 38(2): 441-454. <http://dx.doi.org/10.1007/s10695-011-9525-9>.
- Ketnawa, S.; Benjakul, S.; Ling, T.C.; Martínez-Alvarez, O.; Rawdkuen, S. 2013. Enhanced recovery of alkaline protease from fish viscera by phase partitioning and its application. *Chemistry Central Journal*, 7: 1-9. <http://dx.doi.org/10.1186/1752-153X-7-79>.
- Kuepethkaew, S.; Sangkhak, K.; Benjakul, S.; Klomklao, S. 2017. Use of TPP and ATPS for partitioning and recovery of lipase from Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) hepatopancreas. *Journal of Food Science and Technology*, 54: 3880-3891. <http://dx.doi.org/10.1007/s13197-017-2844-9>.
- Kim, S.K.; Park, P.J.; Kim, J.B.; Shahidi, F. 2002. Purification and characterization of a collagenolytic protease from the filefish, *Novodon modestus*. *Journal of Biochemistry and Molecular Biology*, 35(2): 165-171. <http://dx.doi.org/10.5483/bmbrep.2002.35.2.165>.
- Leong, Y.K.; Lan, J.C.-W.; Loh, H.-S.; Ling, T.C.; Ooi, C.W.; Show, P.L. 2015. Thermoseparating aqueous two-phase systems: Recent trends and mechanisms. *Journal of Separation Science*, 39(4): 640-647. <http://dx.doi.org/10.1002/jssc.201500667>.
- Liu, Y.; Liu, Z.; Song, L.; Ma, Q.; Zhou, D.; Zhu, B.; Shahidi, F. 2019. Effects of collagenase type I on the structural features of collagen fibres from sea cucumber (*Stichopus japonicus*) body wall. *Food Chemistry*, 301: 1-7. <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2019.125302>.
- Nadar, S.S.; Pawar, R.G.; Rathod, V.K. 2017. Recent advances in enzyme extraction strategies: A comprehensive review. *International Journal of Biological Macromolecules*, 101: 931-957. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2017.03.055>.
- Oliveira, V.M.; Assis, C.R.D.; Herculano, P.N.; Cavalcanti, M.T.H.; Bezerra, R.S.; Porto, A.L.F. 2017a. Collagenase from smooth weakfish: extraction, partial purification, characterization and collagen specificity test for industrial application. *Boletim do Instituto de Pesca*, 43(1): 52-64. <http://dx.doi.org/10.20950/1678-2305.2017v43n1p52>.
- Oliveira, V.M.; Nascimento, T.P.; Assis, C.R.D.; Bezerra, R.S.; Porto, A.L.F. 2017b. Study on enzymes of industrial interest in digestive viscera: Greater amberjack (*Seriola dumeril*). *Journal of Coastal Life Medicine*, 5(6): 233-238. <http://dx.doi.org/10.12980/jclm.5.2017J6-300>.
- Oliveira, V.M.; Carneiro Cunha, M.N.; Assis, C.R.D.; Nascimento, T.P.; Herculano, P.N.; Cavalcanti, M.T.H.; Porto, A.L. 2017c. Collagenases de pescado e suas aplicações industriais. *Pubvet*, 11(3): 243-255. <http://dx.doi.org/10.22256/PUBVET.V11N3.243-255>.
- Oliveira, V.M.; Assis, C.R.D.; Silva, J.C.; Silva, Q.J.; Bezerra, R.S.; Porto, A.L.F. 2019. Recovery of fibrinolytic and collagenolytic enzymes from fish and shrimp byproducts: potential source for biomedical applications. *Boletim do Instituto de Pesca*, 45(1): 1-10. <http://dx.doi.org/10.20950/1678-2305.2019.45.1.389>.
- Oliveira, V.M.; Cunha, M.N.C.; Assis, C.R.D.; Silva, J.M.; Nascimento, T.P.; Santos, J.F.; Duarte, C.A.L.; Marques, D.A.V.; Bezerra, R.S.; Porto, A.L.F. 2020. Separation and partial purification of collagenolytic protease from peacock bass (*Cichla ocellaris*) using different protocol: Precipitation and partitioning approaches. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 24: 1-13. <http://dx.doi.org/10.1016/j.beab.2020.101509>.
- Park, J.P.; Lee, S.H.; Byun, H.G.; Kim, S.H.; Kim, S.K. 2002. Purification and characterization of a collagenase from the mackerel, *Scomber japonicus*. *Journal of Biochemistry and Molecular Biology*, 35(6): 576-582. <http://dx.doi.org/10.5483/bmbrep.2002.35.6.576>.
- Phong, W.N.; Show, P.L.; Chow, Y.H.; Ling, T.C. 2018. Recovery of biotechnological products using aqueous two-phase systems. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 126(3): 273-281. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jbiosc.2018.03.005>.
- Poonsin, T.; Sripokar, P.; Benjakul, S.; Simpson, B.K.; Visessanguan, W.; Klomklao, S. 2017. Major trypsin like-serine proteinases from albacore tuna (*Thunnus alalunga*) spleen: biochemical characterization and the effect of extraction media. *Journal of Food Biochemistry*, 41(2): 1-9. <http://dx.doi.org/10.1111/jfbc.12323>.
- Porto, T.S.; Pessoa-Filho, P.A.; Neto, B.B.; Filho, J.L.L.; Converti, A.; Porto, A.L.F.; Pessoa, A. 2007. Removal of proteases from *Clostridium perfringens* fermented broth by aqueous two-phase systems (PEG/citrate). *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, 34(8): 547-552. <http://dx.doi.org/10.1007/s10295-007-0230-8>.
- Rosso, B.U.; Lima, C.D.A.; Porto, T.S.; Nascimento, C.O.; Pessoa, A.; Converti, A.; Carneiro-da-Cunha, M.D.G.; Porto, A.L.F. 2012. Partitioning and extraction of collagenase from *Penicillium aurantiogriseum* in poly(ethylene glycol)/phosphate aqueous two-phase system. *Fluid Phase Equilibria*, 335: 20-25. <http://dx.doi.org/10.1016/j.fluid.2012.05.030>.
- Roy, P.; Bernard, C.; Patrick, D. 1996. Purification, kinetical and molecular characterizations of a serine collagenolytic protease from green shore Crab (*Carcinus maenas*) digestive gland. *Comparative Biochemistry and Physiology. Part B, Biochemistry & Molecular Biology*, 115(1): 87-95. [http://dx.doi.org/10.1016/0305-0491\(96\)00090-9](http://dx.doi.org/10.1016/0305-0491(96)00090-9).
- Senphan, T.; Benjakul, S. 2014. Antioxidative activities of hydrolysates from seabass skin prepared using protease from hepatopancreas of Pacific white shrimp. *Journal of Functional Foods*, 6: 147-156. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jff.2013.10.001>.
- Silva, J.C.; Silva, Q.G.; Oliveira, V.M.; Porto, A.L.F. 2019. Uso de resíduos orgânicos de anchova (*Pomatomus saltatrix*) e robalo-flecha (*Centropomus undecimalis*) para recuperação de proteases alcalinas. In: Aguiar, A.C.; Silva, K.A.; Giovanetti-Deir, S. (orgs). *Resíduos sólidos: impactos ambientais e inovações tecnológicas*. 1ª ed. Recife: EDUFPE, p. 117-126.
- Smith, P.K.; Krohn, R.I.; Hermanson, G.T.; Mallia, A.K.; Gartner, F.H.; Provenzano, M.D.; Fujimoto, E.K.; Goeke, N.M.; Olson, B.J.; Klenk, D.C. 1985. Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Analytical Biochemistry*, 150(1): 76-85. [http://dx.doi.org/10.1016/0003-2697\(85\)90442-7](http://dx.doi.org/10.1016/0003-2697(85)90442-7).
- Souchet, N.; Laplante, S. 2011. Recovery and Characterization of a serine collagenolytic extract from Snow Crab (*Chionoecetes opilio*) by-products. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 163(6): 765-779. <http://dx.doi.org/10.1007/s12010-010-9081-2>.



- Suarez Garcia, E.; Suarez Ruiz, C.A.; Tilaye, T.; Eppink, M.H.M.; Wijffels, R.H.; Van Den Berg, C. 2018. Fractionation of proteins and carbohydrates from crude microalgae extracts using an ionic liquid based-aqueous two-phase system. *Separation and Purification Technology*, 204: 56-65. <http://dx.doi.org/10.1016/j.seppur.2018.04.043>.
- Suarez Ruiz, C.A.; Emmery, D.P.; Wijffels, R.H.; Eppink, M.H.; Van Den Berg, C. 2018. Selective and mild fractionation of microalgal proteins and pigments using aqueous two-phase systems. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology (Oxford, Oxfordshire)*, 93(9): 2774-2783. <http://dx.doi.org/10.1002/jctb.5711>.
- Sripokar, P.; Chaijan, M.; Benjakul, S.; Yoshida, A.; Klomklao, S. 2017. Aqueous two-phase partitioning of liver proteinase from albacore tuna (*Thunnus alalunga*): application to starry triggerfish (*Abalistes stellaris*) muscle hydrolysis. *International Journal of Food Properties*, 20(S2): 1600-1612. <http://dx.doi.org/10.1080/10942912.2017.1350705>.
- Sriket, C.; Benjakul, S.; Visessanguan, W.; Kishimura, H. 2011. Collagenolytic serine protease in freshwater prawn (*Macrobrachium rosenbergii*): characteristics and its impact on muscle during iced storage. *Food Chemistry*, 124(1): 29-35. <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2010.05.098>.
- Statsoft Inc. 2008. Statistica, version 8.0. Tulsa: Statsoft. Inc.
- Teruel, S.R.L.; Simpson, B.K. 1995. Characterization of the collagenolytic enzyme fraction from winter flounder (*Pseudopleuronectes americanus*). *Comparative Biochemistry and Physiology. Part B, Biochemistry & Molecular Biology*, 112(1): 131-136. [http://dx.doi.org/10.1016/0305-0491\(95\)00044-9](http://dx.doi.org/10.1016/0305-0491(95)00044-9).
- Villegas, M.R.; Baeza, A.; Usategui, A.; Ortiz-Romero, P.L.; Pablos, J.L.; Vallet-Regi, M. 2018. Collagenase Nanocapsules: An Approach to Fibrosis Treatment. *Acta Biomaterialia*, 1(74): 430-438. <http://dx.doi.org/10.1016/j.actbio.2018.05.007>.
- Wu, G.P.; Chen, S.H.; Liu, G.M.; Yoshida, A.; Zhang, L.J.; Su, W.J.; Cao, M.J. 2010. Purification and characterization of a collagenolytic serine proteinase from the skeletal muscle of red sea bream (*Pagrus major*). *Comparative Biochemistry and Physiology. Part B, Biochemistry & Molecular Biology*, 155(3): 281-287. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cbpb.2009.11.014>.
- Zhang, D.; Earp, B.E.; Blazar, P. 2019. Risk factors for skin tearing in collagenase treatment of Dupuytren contractures. *The Journal of Hand Surgery*, 44(12): 1021-1025. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jhsg.2019.06.010>.
- Zhao, J.Z.; Blazar, P.E.; Mora, A.; Rozental, T.D.; Earp, B.E. 2019. Clinical outcomes of collagenase injections during a surgeon's initial learning phase. *Journal of Hand Surgery Global Online*, 1(3): 161-165. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jhsg.2019.04.001>.

### 3.5 ARTIGO 2

#### **OBTENÇÃO DO COLÁGENO E HIDRÓLISADO PROTEÍCO A PARTIR DE RESÍDUOS DO ROBALO-FLEXA (*Centropomus undecimalis*)**

Jessica Costa da Silva<sup>1,2</sup>, José Pedro Martins Barbosa Filho<sup>1\*</sup>, Renata Vitória da Silva Sobral<sup>1\*</sup>, Juanize Matias Batista da Silva<sup>2</sup>, Thiago Pajeú Nascimento<sup>3</sup>, Vagnede Melo Oliveira<sup>3</sup>, Ana Lúcia Figueiredo Porto<sup>2</sup>

<sup>1</sup>*Universidade Federal de Pernambuco, Departamento de Ciências Farmacêuticas<sup>1\*</sup>*

<sup>2</sup>*Universidade Federal Rural de Pernambuco, Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal*

<sup>3</sup>*Universidade Federal do Piauí*

<sup>4</sup>*Universidade Federal do Acre, Centro de Ciências da Saúde e do Desporto-CCSD*

#### **Resumo/Abstract**

The growth in fish consumption has been increasing in recent years and this is linked to the search for a healthy, balanced diet, a source of high protein content, fast digestion process and low cost. These benefits have been very satisfactory for people who have some type of comorbidity, especially for hypertensive, diabetic and morbidly obese people. From the skin, acid-soluble collagen (ASC) and pepsin-soluble collagen (PSC) were obtained. Both collagens (ASC and PSC) were hydrolyzed and characterized using electrophoresis and Fourier Transform Infrared Spectroscopy (FT-IR). In the SDFA purification process, the enzyme was concentrated in polyethylene glycol (PEG) and presented a yield of 3.91. The ASC and PSC collagen yields were 7.28% and 9.06% based on dry weight. In hydrolysis, the peptides had higher production after the period of 36 hours. In the electrophoresis, it was possible to verify the electrophoretic profile of the collagens with the presence of two bands in each band (ASC and PSC) with a variation of 200 kDa to 120 kDa, being more intense in the (PSC). already in the hydrolysis, the peptides the variation was of 70 kDa to 32 k. In FT-IR, the presence of amino acids and imino acids (proline and hydroxyproline) of intact collagen molecules, known as amide A, amide B, amide I and amide II and

amide III, were verified. In view of this study, it was possible to verify the importance of reusing fish by-products for the extraction of biomolecules and their ability to produce peptides, making them relevant for a future investigation of their biological potential.

**Palavras-chave/Key words:** Collagen, Fish by-products, peptide fractions.

## 1. Introdução

O crescimento do consumo de peixes tem sido cada vez maior nos últimos anos e isso está atrelado à busca por uma alimentação saudável, balanceada, fonte de alto teor proteico, rápido processo de digestão e de baixo custo. Esses benefícios têm sido muito satisfatório para pessoas que possuem algum tipo de comorbidade, principalmente, para hipertensos, diabéticos e obesidade mórbida.

Em paralelo a esse alto consumo, destaca-se a quantidade de resíduos gerados pela comunidade pesqueira e indústrias de pescado, que por sua vez, podem ser reaproveitados a partir de ossos, pele, dentina, barbatanas, escamas, vísceras intestinais, para a obtenção de biomoléculas de interesse comercial e biotecnológico como o colágeno. (KARAYANNAKIDIS & ZOTOS, 2016; VIJI et al., 2019; VÄLIMAA et al., 2019).

O colágeno de subprodutos de peixe tem sido uma excelente alternativa para aplicações biotecnológicas, pois apresenta grande aplicabilidade nas indústrias farmacêuticas, cosméticos, terapêuticas, biomédica, farmacêutica devido as suas propriedades biológicas, consistência e qualidade (SULTANA et al., 2018; SUN et al., 2019). A partir do colágeno também pode ser obtido, por meio de hidrólise, os peptídeos que, por sua vez, também possuem várias aplicações e potencial biológico. Diante da importância do colágeno obtido através dos resíduos de peixe, o objetivo deste trabalho foi obter colágeno e hidrolisados proteicos a partir de resíduos do peixe robalo-flexa (*Centropomus undecimalis*) como potencial para possíveis aplicações na indústria de cosméticos e alimentícia.

## 2. Material e métodos

### 2.1. Obtenção dos resíduos

Os resíduos digestivos e a pele de (*C. Undecimalis*) foram fornecidos pelo Mercado São José, Recife, Pernambuco, Brasil. O material biológico foi transferido sob condições térmicas para o Laboratório de Avanços em Biotecnologia de Proteínas e Tecnologia de Bioativos - Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal (DMFA) - Universidade Federal Rural de Pernambuco.

## 2.2 Preparação do extrato bruto

Na produção do extrato bruto de robalo-flexa (*C. undecimalis*) foram utilizados resíduos do intestino, na proporção de 1:5 (p/v) de tecido para tampão de extração (0,50 M Tris-HCl pH 7,5, contendo 5mM CaCl<sub>2</sub>) (Sigma, St. Louis, MO, EUA). Após a maceração, a suspensão foi homogeneizada por 5 min, 10.000 rpm e à 4°C, em intervalos de 5 min., utilizando um homogeneizador de tecidos, referência TE -099, Unidade Potter TECNAL). O homogeneizado foi centrifugado duas vezes por um período de 30 min (cada), a 10.000 g e a 4°C, utilizando a centrífuga HERMLE Z-513K. Após a centrifugação, o sobrenadante foi definido como extrato bruto, sendo utilizado para a etapa de purificação.

### 2.3.1 Obtenção do extrato bruto e extrato parcialmente purificado

As amostras parcialmente purificadas pelo Sistema de Duas Fases Aquosas (SDFA) foram obtidas de acordo com SILVA et al. (2020) através de um planejamento fatorial 2<sup>4</sup>, onde foi analisado o efeito das variáveis: massa molar do polietilenoglicol- PEG (400, 3350 e 8000), concentração de PEG (20, 22 e 24), concentração de citrato de sódio (15%, 20%, 22% e 25%) e pH (6, 7 e 8).

## 2.3 Determinação de proteínas totais

A concentração de proteína foi determinadas de acordo com Smith et al. (1985).

## 2.4 Pré-tratamento colágeno

O colágeno foi extraído a partir da pele de robalo-flexa (*C. undecimalis*). O procedimento de pré-tratamento dos resíduos de pele foi realizado de acordo como método descrito por Oliveira et al. (2019). Para a remoção de proteínas não-

colagenosas, os resíduos de pele foram a princípio misturados a uma solução de NaOH (0,2M) a uma proporção de 1:10 (p/v) e agitadas continuamente por 3 horas, sendo realizada as trocas a cada 30 min. Após agitação, lavagem com água destilada e aferição de pH, a pele tratada foi adicionada a uma solução de 10% de álcool butílico na proporção de 1:10 (p/v) e mantida sob agitação durante 6 horas para remoção de gorduras. A etapa final do pré-tratamento (branqueamento) foi realizada utilizando uma solução de 3% de peróxido de hidrogênio, onde os resíduos de pele foram mantidos sob agitação por 1 hora. Todos os procedimentos do pré-tratamento foram realizados sob refrigeração a 4°C.

#### 2.4.1 Extração do colágeno (ASC e PSC)

O isolamento do colágeno solúvel em ácido (ASC) foi realizada segundo Hukmi; Sarbon (2018). Os resíduos obtidos após o pré-tratamento misturados a uma solução de ácido acético (0,5M) na proporção de 1:10 (p/v) e mantidos sob agitação contínua por 24 horas (4°C). Para a extração do colágeno solúvel pepsina (PSC) foi seguido o mesmo padrão que foi realizado o ASC, com a adição de 600 mg de pepsina gástrica de mucosa suína (SIGMA cod. 1002599540). Em seguida, o material foi centrifugado a 10.000 rpm por 30 minutos. Os sobrenadantes resultantes foram separados e submetidos a uma reextração com ácido acético 0,5 M por 12 horas e nova centrifugação utilizando a centrífuga HERMLE Z-513K. A precipitação do colágeno extraído foi realizada utilizando solução tampão de carbonato-bicarbonato com pH 8,8. Em seguida foi realizada a centrifugação, diálise (48 horas) e liofilização do colágeno precipitado.

#### 2.4.2 Rendimento do colágeno ASC e PSC

O rendimento do colágeno (ASC e PSC) foram calculados a partir da equação: rendimento (%) = peso de colágeno seco (g) x 100/peso de pele de robalo-flexa (*C. undecimalis*) seca (g).

#### 2.5 Preparação do hidrolisado de colágeno

A hidrólise do colágeno extraído da pele de robalo-flexa (*Centropomus undecimalis*) foi realizado de acordo com o método de Moore & Stein (1954) e Park et al., (2002) com modificações. Uma mistura contendo 5 mg de colágeno, 1 mL de solução

tampão Tris-HCl 0,5 mM, pH 7,5 contendo 0,50 mM  $\text{CaCl}_2$ , e 0,2 mL da collagenase (extrato bruto e a amostra parcialmente purificada pelo SDFA), essas mesmas amostras foram usadas para hidrolisar o Colágeno tipo I, obtido do tendão de Aquiles bovino e incubadas por 12, 24, 36, 48, 60 e 72 horas, em banho termostático a 37°C. A reação foi interrompida pela adição de 0,2 mL de ácido tricloroacético a 50%. Em seguida a solução foi centrifugada a 8000 rpm por 20 minutos. Posteriormente, 0,2 mL do sobrenadante foi misturado com 1 mL de uma solução de ninhidrina (4%), incubada a 100°C por 20 minutos. A seguir, cada amostra foi diluída em 5 mL de 1-propanol 50% e sua absorbância foi mensurada a 570 nm. A curva padrão foi determinada utilizando leucina nas concentrações 0, 1,0; 1,5; 2,0; 2,5; 3,0; 3,5; e 4,0 mM.

## 2.6 Caracterização Estrutural do Colágeno

### 2.6.1 Espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier

O espectro de absorção ultravioleta da pele do robalo-flexa foram registrados por um espectrofotômetro (Agilent Technologies), modelo Cary 630 FTIR, ATR (Reflectância Total Atenuada) com cristal de diamante e seleneto de zinco, na faixa espectral de  $400\text{ cm}^{-1}$  a  $4000\text{ cm}^{-1}$ . Foram utilizados 5 mg do colágeno da pele do robalo-flexa (*C. undecimalis*) ASC e PSC.

### 2.6.2 SDS-PAGE do colágeno e hidrolisado proteico

A eletroforese em gel de dodecil sulfato de sódio-poliacrilamida (SDS-PAGE) foi realizada de acordo com (Laemmli, 1970). Foram utilizados 10 µL de colágeno (ASC e PSC) e os hidrolisados proteicos de (ASC, PSC e comercial), gel de concentração de 4% e o gel de separação foi de 12% e foram submetidos a eletroforese juntamente com uma corrente constante de 15 mA por gel. Após a eletroforese, o gel foi corado com solução de coloração azul de R-250 brilhante Coomassie a 0,02% (v/v) em 50% (v/v) metanol e 7,5% (v/v) de ácido acético são considerados bons.



### 3. Resultados e Discussão

#### 3.1 Extração do colágeno ASC e PSC

Neste estudo, observou-se que o rendimento do colágeno extraído a partir de pele de robalo-flexa (*C. undecimalis*) pelo método ASC e PSC foi 7,28% e 9,06%, respectivamente com base no peso seco. Esses rendimentos são considerados bom levando em consideração que o rendimento pode ser baixo, como podemos observarmos diferentes espécies (Tabela 1). É importante salientar que o rendimento varia de acordo com a espécie, hábitat, alimentação e o período de captura da espécie.

Tabela 1. Colágeno extraído a partir de resíduos de pele de diferentes espécies.

Espécie	Tecido	Método deExtração*	Rendimento	Autor
<i>Istiophorus platyterus</i>	Pele	ASC	5,76%	Tamilmozhi et al. (2013)
<i>Istiophorus platyterus</i>	Pele	PSC	2,11%	Tamilmozhi et al. (2013)
<i>Brama australis</i>	Pele	ASC	1,5%	Sionkowska et al. (2015)
<i>Sepia pharaonis</i>	Pele	ASC	1,66%	Krishnamoohiet al. (2017)
<i>Sepia pharaonis</i>	Pele	PSC	3,93%	Krishnamoohiet al. (2017)
<i>Cichla ocellaris</i>	Pele	PSC	2,9%	Oliveira et al.(2018)
<i>Nibeia japonica</i>	Pele	PSC	8,67%	Yu et al.(2018)
<i>Yellowfin tuna</i>	Pele	ASC	3,18%	Nurilmala et al.(2019)

Método de extração\* Colágeno ácido-solúvel (ASC) e colágeno pepsino-solúvel (PSC).

#### 3.2 Hidrolisado proteico do colágeno

Nas figuras 1, 2 e 3 é possível observar a hidrólise dos colágenos (ASC, PSC e Comercial). As amostras da enzima collagenolítica (EB e SDFA) foram capazes de hidrolisar o colágeno extraído, em período de tempo similares, obtendo o pico da hidrólise de (ASC e PSC) em 36h, enquanto o colágeno comercial hidrolisado apresentou maior pico em 48h. Estudo realizado por Oliveira et al.,

(2017) apresenta a hidrólise colágeno comercial do tendão de Aquiles bovino (colágeno tipo I) por um período de 48 horas com proteases colagenolíticas extraídas da pescada-branca (*Cynoscion leiarchus*).

Figura 1. Hidrólise do colágeno extraído do robalo-flexa (*C. undecimalis*) pelo método ASC (Colágeno ácido solúvel), utilizando amostras de enzima colagenolítica (extrato bruto e parcialmente purificado por Sistema de Duas Fases Aquosas) por diferentes períodos de incubação (0, 12, 36, 48, 60, 72h) na temperatura de 37°C.

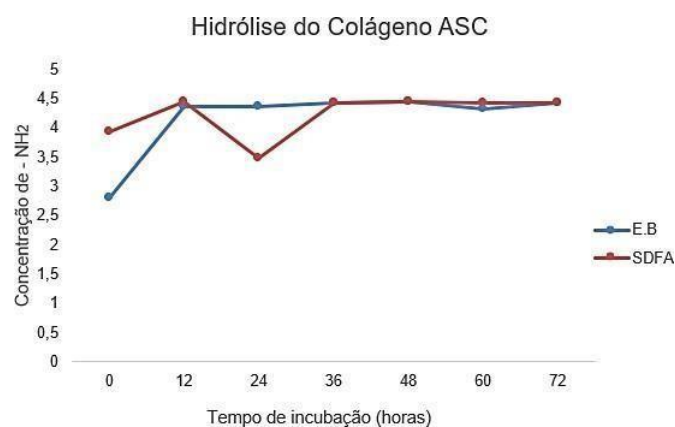


Figura 2. Hidrólise do colágeno extraído do robalo-flexa (*C. undecimalis*) pelo método PSC (Colágeno ácido solúvel), utilizando amostras de enzima colagenolítica (extrato bruto e parcialmente purificado por Sistema de Duas Fases Aquosas) por diferentes períodos de incubação (0, 12, 36, 48, 60, 72h) na temperatura de 37°C.

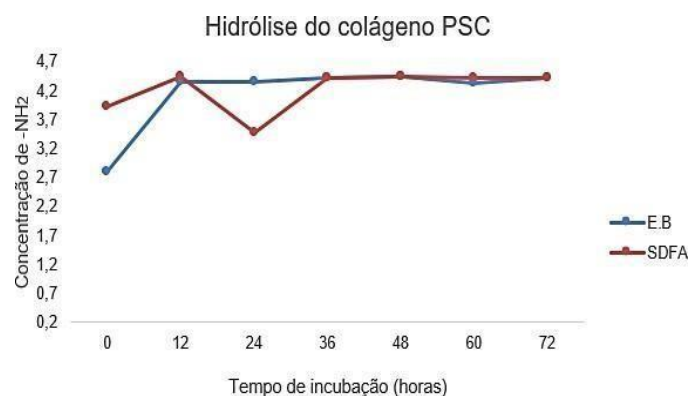
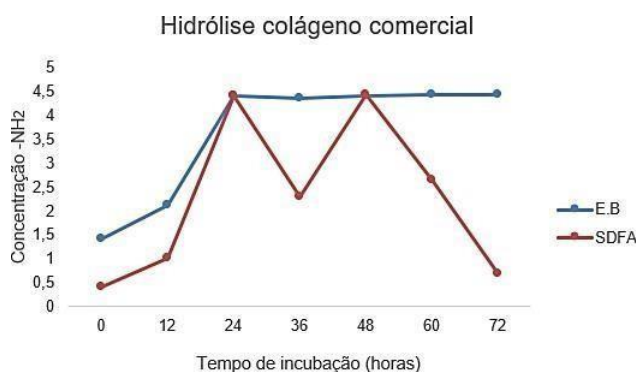


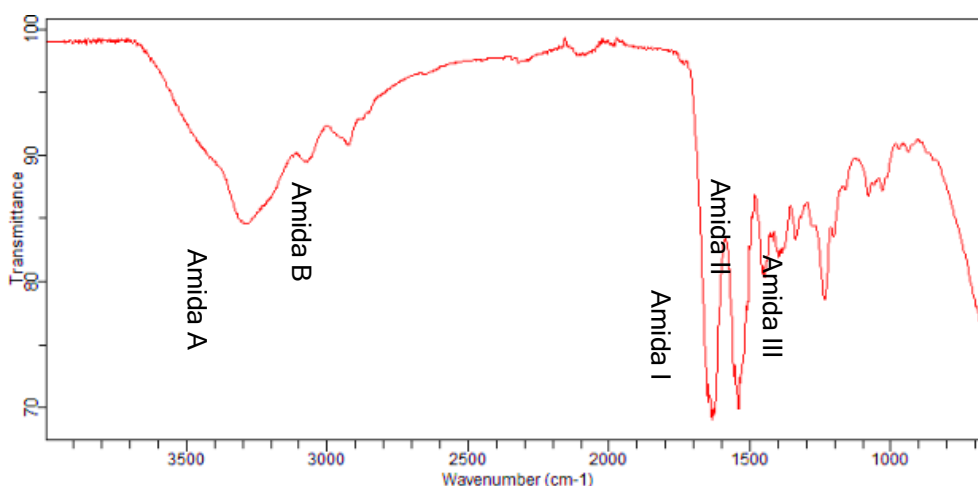
Figura 3. Hidrólise do colágeno I do tendão de Aquiles bovino, utilizando amostras de enzima colagenolítica (extrato bruto e parcialmente purificado por Sistema de Duas Fases Aquosas) por diferentes períodos de incubação (0, 12, 36, 48, 60, 72h) na temperatura de 37°C.



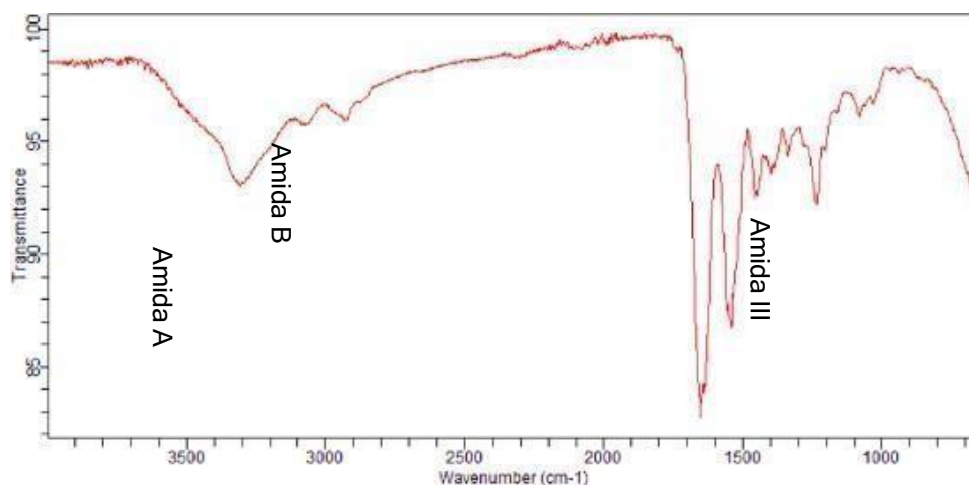
### 3.1 Espectroscopia de infravermelho transformada Fourier (FTIR)

Os espectros de FT-IR do colágenos (ASC) e (PSC) da pele de robalo-flexa (*C. undecimalis*) apresentam cinco picos característicos de ligações amida que são os marcadores mais comuns do polipetídeo, conhecidas como amida A, amida B e bandas de amida I, amida II e amida III. Esses resultados corroboram com os estudos realizados com o colágeno de pele extraídos por métodos ASC e PSC de (*Catla catla*) Kumar et al. (2015), (*Labeo rohita*) Cozza et al. (2016), (*Oreochromis niloticus*) Sun et al. (2017) e (*Cichla ocellaris*) Oliveira et al. (2019). Pode-se observar através da imagens do FTIR dos colágenos ASC e PSC que as bandas de amida estão intactas, o que são muito similares aos do colágeno já utilizados na indústria de cosméticos (OLIVEIRA et al., 2021).

Figura 4. Espectro de FTIR do colágeno ASC extraído da pele de robalo-flexa (*C. undecimalis*).



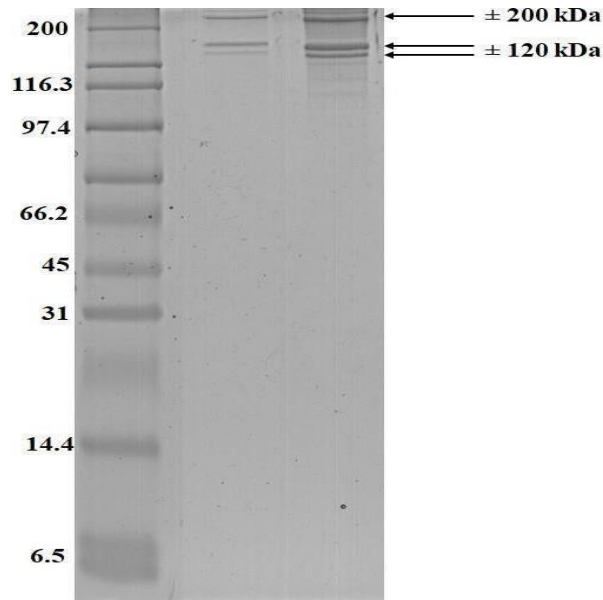
3.1 Figura 5. Espectro de FTIR do colágeno PSC extraído da pele de robalo-flexa (*C. undecimalis*)



### 3.2 Perfil eletroforético do colágeno e hidrolisados proteicos por SDS-PAGE

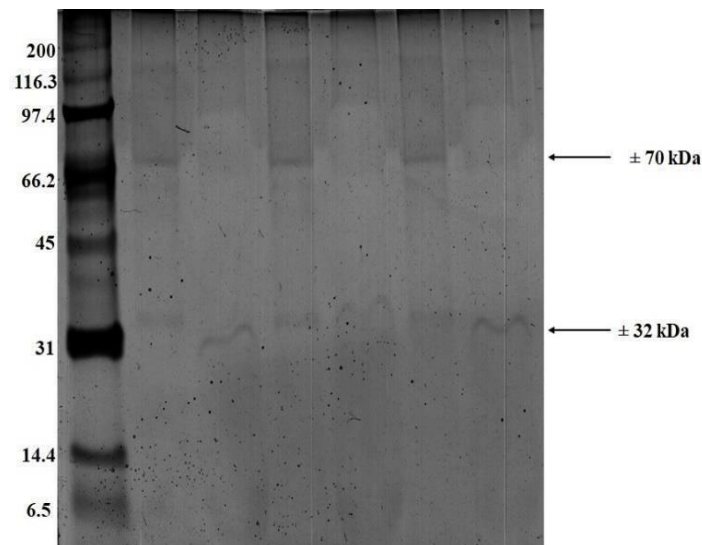
O perfil eletroforético da extração de colágeno do robalo-flexa (*C.undecimalis*) pelos métodos (ASC e PSC) são mostrados na figuras 6. Ambos colágenos exibiram padrão semelhantes, compreendendo parcialmente entre 200 kDa e 120 kDa, respectivamente. Em ambos os colágenos foi observada a presença de duas cadeias ( $\alpha 1$  e  $\alpha 2$ ) nas faixas 1 e 2, sendo nesta última com maior intensidade. O padrão eletroforético desses dois métodos de extração são semelhantes ao estudos realizado por Sun et al., (2017), com bacalhau do pacífico (*Godus macrocephalus*), Oliveira, et al., (2019) com o tucunaré (*Cichla ocellaris*) e tilápia Bl et al., (2019). O perfil eletroforético dos colágenos hidrolisados (ASC, PSC e comercial) mostrados na (figura 7) variaram de 70 kDa a 32 kDa, vale ressaltar que o hidrolisado pela enzima parcialmente purificada, nas faixas 2, 4 e 6 são visíveis em 32kDa. Um estudo realizado por ZAMORANO-APODACA et al. (2020) mostra a variação de 27kDa a 1kDa em hidrolisados de colágeno (ASC), em que é possível observar a presença de peptídeos mesmo abaixo de 1kDa. A partir dessa eletroforese podemos diferenciar o colágeno e o hidrolisado proteico através do peso da massa molar em kDa, mostrando a presença de pequenas bandas (Figura 6), mas que ainda não é viável afirmar como peptídeos devido a sua massa molar ser maior comparada as que já foram registradas na literatura. Nesse caso, será interessante a confirmação de novos estudos para definir a presença de peptídeos.

Figura 6. Perfil eletroforético de colágeno da pele de robalo-flexa (*C. undecimalis*). Marcador de massa molar, linha 1: ASC; linha 2: PSC.



Fonte: Própria

Figura 7. Perfil eletroforético do colágeno de hidrolisado da pele de robalo-flexa (*C. undecimalis*). Marcador de massa molar, linha 1: Hidrolisado (ASC) com a enzima collagenolítica; linha 2: Hidrolisado (ASC) com a enzima parcialmente purificada por Sistema de Duas Fases Aquosas (SDFA); linha 3. Hidrolisado (PSC) com o extrato bruto; linha 4: Hidrolisado (PSC) com o SDFA; linha 5. Hidrolisado do colágeno comercial do tendão de Aquiles bovino com extrato bruto; linha 6. Hidrolisado do colágeno comercial do tendão de Aquiles bovino com (SDFA).



Fonte: Própria

#### 4. CONCLUSÕES

Neste estudo foi possível obter o colágeno e hidrolisados proteicos a partir resíduos de robalo-flexia (*C. undecimalis*), permitindo que esses subprodutos agreguem valor comercial para as indústrias de peixes, sejam valorizados no mercado e reaproveitados para futuras aplicações industriais tendo em vista que a estrutura deste colágeno é semelhante aos colágenos utilizados na indústria de cosméticos.

#### 5. AGRADECIMENTOS

A FACEPE, CAPES e CNPQ pelo financiamento deste projeto durante atodo o período de desenvolvimento da pesquisa.

#### REFERÊNCIAS

AHMED, M., VERM, A. K., PATEL, R. Collagen extraction and recent biological activities of collagen peptides derived from sea-food waste: A review. **Sustainable Chemistry and Pharmacy**, v.18, p. 1-13, 2020. Disponível em: 100315. doi:10.1016/j.scp.2020.100315

KRISHNAMOORTHY, J., RAMASAMY, P., SHANMUGAM, V. SHANMUGAM, A. Isolation and partial characterization of collagen from outer skin of *Sepia pharaonis* (Ehrenberg, 1831) from Puducherry coast. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, 10: 39-45, 2017.

NURILMALA, M., FAUZI, S., MAYASARI, D., BATUBARA, I. Collagen extraction from yellowfin tuna (*Thunnus albacares*) SKIN and its antioxidant activity. **Journal Teknologi** 81 (2), 2019.

OLIVEIRA, V. M., ASSIS, C. R. D., HERCULANO, P. N., CAVALCANTI, M. T. H., BEZERRA, R. S., PORTO, A. L. P. Collagenase from smooth weakfish: extraction, partial purification, characterization and collagen specificity test for industrial application. **Boletim do Instituto de Pesca**, v. 43, n. 1, p. 52-64, 2017.

OLIVEIRA, V. O., COELHO, A. N. R., DUARTE, M. F. T., ROBERTO, N. A., SILVA, H. M. C., DIAS, C. R. A., PORTO, A. L. F. Crosslink-free collagen from *Cichla ocellaris*: structural characterization by FT-IR spectroscopy and densitometric evaluation. **Journal of Molecular Structure**, p.1-34 2018. Disponível em: doi:10.1016/j.molstruc.2018.09.02

SUN, L. et al. Nile tilapia skin collagen sponge modified with chemical cross-linkers as a biomedical hemostatic material. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 159, p. 89-96, 2017.

SIONKOWSKA, A., KOZŁOWSKA, J., SKORUPSKA, M., MICHALSKA, M. Isolation and characterization of collagen from the skin of *Brama australis*. *International Journal of Biological Macromolecules*, 80: 605-609, 2015.

TAMILMOZHI, S., VEERURAJ, A., ARUMUGAM, M. Isolation and characterization of acid and pepsinsolubilized collagen from the skin of sailfish (*Istiophorus platypterus*). *Food Research International*, 54: 1499-1505, 2013.

ZAMORANO-APODACA, J., GARCÍA-SIFUENTES, C. O., CARVAJAL-MILLÁN, E., VALLEJO-GALLAND, B., SCHEUREN-ACEVEDO, S. M., MARÍA ELENA, L. S. Biological and functional properties of peptide fractions obtained from collagen hydrolysate derived from mixed by-products of different fish species. **Food Chemistry**, 127350. doi:10.1016/j.foodchem.2020.1273

YU, F.; ZONG, C., JIN, S., ZHENG, J., CHEN, N., HUANG, J., CHEN, Y., HUANG, F., YANG, Z., TANG, Y. Optimization of extraction conditions and characterization of pepsin-solubilised collagen from skin of giant croaker (*Nibea japonica*). **Mar. Drugs** 16 (1), 29, 2018.

## CONCLUSÕES

Diante de esse estudo, foi possível agregar valor e verificar a importância do reaproveitamento dos subprodutos de peixes para a obtenção da enzima colagenolítica, colágeno e hidrolisados proteicos a partir do robalo-flexá (*C. undecimalis*). Além disso, apresentam potencial para produção de peptídeos e para futuras aplicações biotecnológicas, tendo em vista que o colágeno em estudo apresenta características semelhantes ao aplicado na indústria de cosméticos.



## REFERÊNCIAS

- ABDELHEDI, O., NASRI, R., MORA, L., TOLDRÁ, F., NASRI, M., JRIDI, M. Collagenous proteins from black-barred halfbeak skin as a source of gelatin and bioactive peptides. **Food Hydrocolloids**, v.70, p.123-133, 2017.
- ABDELHEDI, O., JRIDI, M., NASRI, R., MORA, L., TOLDRÁ, F., NASRI, M. Rheological and structural properties of *Hemiramphus far* skin gelatin: Potential use as an active fish coating agent. **Food Hydrocolloids**, v. 87, p. 331-34, 2019.
- AKSUN TÜMERKAN, E.T., CANSU, Ü., BORAN, G., REGENSTEIN, J.M., ÖZOĞUL, F. Physicochemical and functional properties of gelatin obtained from tuna, frog and chicken skins. **Food Chemistry**, v. 287, p. 273-279, 2019.
- ALI, A.M.M., KISHIMURA, H., BENJAKUL, S. Physicochemical and molecular properties of gelatin from skin of golden carp (*Probarbus jullieni*) as influenced by acid pretreatment and prior-ultrasonication. **Food Hydrocolloids**, v. 82, 9. 164-172, 2018.
- ALI, E., SULTANA, S., HAMID, S., HOSSAIN, M., YEHYA, W.A., KADER, A., BHARGAVA, S.K. Gelatin controversies in food, pharmaceuticals, and personal care products: Authentication methods, current status, and future challenges. **Critical reviews in food science and nutrition**, v.58, n.9, p.1495-1511, 2018.
- ALIPOUR, H., RAZ, A., ZAKERI, S. DJADID, N. D. Therapeutic applications of collagenase (metalloproteases): A review. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, v. 6, p. 975- 981, 2016.
- ALTAN KAMER, D.D., PALABIYIK, I., ISIK, N.O., AKYUZ, F., DEMERCI, A.S., GUMUS, T. Effect of confectionery solutes on the rheological properties of the fish (*Oncorhynchus mykiss*) gelatin. **LWT**, v. 101, p. 499-505, 2018.
- ARFAT, Y.A., AHMED, J., HIREMATH, N., AURAS, R., JOSEPH, A. Thermo-mechanical, rheological, structural and antimicrobial properties of bionanocomposite films based on fish skin gelatin and silver-copper nanoparticles. **Food Hydrocolloids**, v. 62, p. 191-202, 2017.
- AHMED, M., VERMA, A. K., PATEL, R. Collagen extraction and recent biological activities of collagen peptides derived from sea-food waste: A review. *Sustainable Chemistry and Pharmacy*, v.18, p. 1-13, 2020. 100315. doi:10.1016/j.scp.2020.100315
- ARUMUGAM, G.K.S., SHARMA, D., BALAKRISHNAN, R.M., ETTIYAPPAN, J.B.P. Extraction, optimization and characterization of collagen from sole fish skin. **Sustainable Chemistry and Pharmacy**, v.9, p.19-26, 2018.

BECHMANN, N. et al. Anti-Tumorigenic and Anti-Metastatic Activity of the Sponge-Derived Marine Drugs Aerophysinin-1 and Isofistularin-3 against Pheochromocytoma *In Vitro*. **Marine Drugs**, v.16, 1-15, 2018.

BENJAKUL, S., KITTIPHATTANABAWON, P. Gelatin. **Module in Food Science**, 2018. Disponível em: doi:10.1016/b978-0-08-100596-5.21588-6

BKHAIRIA, I., MHAMDI, S., JRIDI, M., NASRI, M. New acidic proteases from *Lizaauratavisera*: Characterization and application in gelatin production. **International Journal of Biological Macromolecules**, v.92, p.533-542, 2016.

CASANOVA, F., MOHAMMADIFAR, M.A., JAHROMI, M., PETERSEN, H.O., EYBYE, K.L., KOBELGAARD, S., JESSEN, F. Physico-chemical, structural and techno-functional properties of gelatin from saithe (*Pollachius virens*) skin. **International Journal of Biological Macromolecules**, v.156, p.918-927, 2020.

CHAUHAN, S., GAUTAM, M., AZMI, W. An overview on therapeutic potential and various applications of microbial collagenases. *Journal of Microbiology and Biotechnology Research*, n.7, v.6, p. 17-29, 2017.

CHUNG, D. Fish gelatin. *Biopolymer-Based Formulations*, p.67-85, 2020.

CHEUNG, I.W.Y.; LI-CHAN, E.C.Y. Enzymatic production of protein hydrolysates from steelhead (*Oncorhynchus mykiss*) skin gelatin as inhibitors of dipeptidyl-peptidase IV and angiotensin-I converting enzyme. **Journal of Functional Foods**, v.28, p.254-264, 2017.

FAO. 2020. **The State of World Fisheries and Aquaculture 2020**. Sustainability in action. Rome.

FAUZI, M.B.; LOKANATHAN, Y.; AMINUDDIN, B.S.; RUSZYMAH, B.H.I.; CHOWDHURY, R.S. Ovine tendon collagen: Extraction, characterisation and fabrication of thinfilms for tissue engineering applications. **Materials Science and Engineering**, v.68, p.163-171, 2016.

FELICIAN, F.F. et al. Collagen from Marine Biological Sources and Medical. **Chemistry & Biodiversity**, v.15, 1-18, 2018.

GIORDANO et al. Biotechnological applications of bioactive peptides from marine sources. **Advances in Microbial Physiology**, p.1-50, 2018.

HUANG, T., TU, Z., SHANGGUAN, X., WANG, H., SHA, X., BANSAL, N. Rheological

behavior, emulsifying properties and structural characterization of phosphorylated fish gelatin. **Food Chemistry**, v. 246, p. 428-436, 2018.

HUANG, T., TU, Z.-C., WANG, H., SHANGGUAN, X., ZHANG, L., ZHANG, N.-H., BANSAL. Pectin and enzyme complex modified fish scales gelatin: Rheological behavior, gel properties and nanostructures. **Carbohydrate polymers**, v.156, n.535, p.294-302, 2017.

JACOB, J. et al. Biopolymer based nanomaterials in drug delivery systems: A review. **Materials Today Chemistry**, v.9, p. 43-55, 2018.

JEEVITHAN, E. et al. Purification, characterization and antioxidant properties of low molecular weight collagenous polypeptide (37 kDa) prepared from whale shark cartilage (*Rhincodon typus*). **Journal of Food Science and Technology**, v.52, p. 6312-6322, 2015.

KARAYANNAKIDIS, P.D., ZOTOS, A. Fish processing by-products as a potential source of gelatin: a review. **Journal of Aquatic Food Product Technology**, v.25, p.65-92, 2016.

KWATRA, B. Collagen supplementation: therapy for the prevention and treatment of osteoporosis and osteoarthritis: a review. **World journal of pharmacy and pharmaceutical sciences**, v.9, n.5, p.589-604, 2020.

LAURINDO, E. E., BARROS, I.R. F. Encefalopatia espongiforme bovina atípica: uma revisão. **Arquivo do Instituto Biológico**, v.84, p.1-10, 2017.

LEÓN-LÓPEZ, A., MORALES-PEÑALOZA, A., MARTÍNEZ-JUÁREZ, V. M., VARGAS-TORRES,

A.; ZEUGOLIS, D. I.; AGUIERRE-ÁLVAREZ, G. Hydrolyzed Collagen—Sources and Applications.

**Molecules**, v. 24, n. 22, p. 4031, 2019.

LIMA, C. A., JÚNIOR, A. C. V. F., FILHO, J. L. L., CONVERTI, A., MARQUES, D. A. V.,

CARNEIRO-DA-CUNHA, M. G., PORTO, A. L. F. Two-phase partitioning and partial characterization of a collagenase from *Penicillium aurantiogriseum* URM4622: Application to collagen hydrolysis. **Biochemical Engineering Journal**, n.75, p.64-71, 2013.

LIMA-JUNIOR, E.M., PICOLO, N.S., MIRANDA, M.J.B., RIBEIRO, W.L.C., ALVES, A.P.N.N., FERREIRA, G.E., PARENTE, E.A., MORAES-FILHO, M.O. Uso da pele de tilápia (*Oreochromis niloticus*), como curativo biológico oclusivo, no tratamento de queimaduras. **Revista Brasileira de Queimaduras**, n.16, v. 1, p.10-17, 2017.

LIU, D., NIKOO, M., BORAN, G., ZHOU, P., REGENSTEIN, J.M. Collagen and gelatin. **Annual review of food science and technology**, v.6, p.527-557, 2015.

LIU, J., YONG, H., LIU, Y., QIN, Y., KAN, J., LIU, J. Preparation and characterization of active and intelligent films based on fish gelatin and haskap berries (*Lonicera caerulea* L.) extract. **Food Packaging and Shelf Life**, v.22, artigo 100417, 2019.

LIU, Y., LI, B., ZHANG, K., LI, J., HOU, H. Novel hard capsule prepared by tilapia (*Oreochromis niloticus*) scale gelatin and konjac glucomannan: characterization, and *in vitro* dissolution. **Carbohydrate Polymers**, v.206, p.254-261, 2018.

LIN-CHEN, LV., HUANG, Q.-Y., DING, W., XIAO, X.-H., ZHANG, H.-Y., XIONG, L.-X. Fish gelatin: The novel potential applications. **Journal of Functional Foods**, v.63, p.1-14, 2019.

LIN, L., REGENSTEIN, J.M., LV, S., LU, J., JIANG, S. An overview of gelatin derived from aquatic animals: Properties and modification. **Trends in Food Science & Technology**, v.68, p.102-112, 2017.

MIRZAPOUR-KOUHDASHT, A., MOOSAVI-NASAB, M., KRISHNASWAMY, K., KHALES, M. Optimization of gelatin production from Barred mackerel by-products: Characterization and hydrolysis using native and commercial proteases. **Food Hydrocolloids**, v.108, p.1-14, 2020.

MIRZAPOUR KOUHDASHT, A., MOOSAVI-NASAB, M., AMINLARI, M. Gelatin production using fish wastes by extracted alkaline protease from *Bacillus licheniformis*. **Journal of food Science and Technology**, v.1, p.1-6, 2018.

OLIVEIRA, V.M., CUNHA, M.N.C., NASCIMENTO, T.P., ASSIS, C.R.D., BEZERRA, R.S., PORTO, A.L.F. Colágeno: características gerais e produção de peptídeos bioativos - uma revisão com ênfase nos subprodutos do pescado. **Actapesca**, v.2, p.70-82, 2017a.

OLIVEIRA, V.M., CARNEIRO CUNHA, M.N., ASSIS, C.R.D., NASCIMENTO, T.P., HERCULANO, P. N., CAVALCANTI, M.T.H., PORTO, A. L. Colagenases de pescado e suas aplicações industriais. **Pubvet**, v.11, n.3, p. 243-255, 2017b.

OLIVEIRA, V.M., ASSIS, C. R. D., SILVA, J.C., SILVA, Q. J., BEZERRA, R. S., PORTO, A. L. F. Recovery of fibrinolytic and collagenolytic enzymes from fish and shrimp byproducts: potential source for biomedical applications. *Boletim do Instituto de Pesca*, v. 1, n. 45, p. 1- 10, 2019.

PANG, Z., DEETH, H., YANG, H., PRAKASH, S., BANSAL, N. Evaluation of tilapia skin gelatin as a mammalian gelatin replacer in acid Milk gels and low-fat stirred yogurt. **Journal of Dairy Science**, v.100, n.5, p.3436-3447, 2017.

PEPCZYŃSKA, M., DÍAZ-CALDERÓN, P., QUERO, F., MATIACEVICH, S., CHAR, C., ENRIONE, J. Interaction and fragility study in salmon gelatin-oligosaccharide composite films at low moisture conditions. **Food Hydrocolloids**, v.97, p.105-207, 2019.

PEREIRA, M. E. G. S., SILVA, B. B., ROCHA, R. M., ASP-NETO, N. E., SILVA, C. S., NUNES, Z. M. P. Bioecologia do robalo-flexa, *Centropomus undecimalis*, EM LAGOA COSTEIRA TROPICAL NO NORTE DO BRASIL **Boletim do Instituto de Pesca**, São Paulo, 41(3): 457 – 469, 2015.

PORFIRIO, E., FANARO, G.B. Collagen supplementation as a complementary therapy for the prevention and treatment of osteoporosis and osteoarthritis: a systematic review. **Revista Brasileira de Geriatria e Gerontologia**, v. 19, n. 1, p. 153-164, 2016.

RENUKA, V., RAO RAVISHANKAR, C.N., ZYNUDHEEN, A.A., BINDU, J., JOSEPH, T.C. Characterization of gelatin obtained from unicorn leather jacket (*Aluterus monoceros*) and reef cod (*Epinephelus diacanthus*) skins. **LWT- Food Science and Technology**, Disponível em: 108586.doi:10.1016/j.lwt.2019.108586.

RONG, L. et al. Biomedical applications of functional peptides in nano-systems. **Materials Today Chemistry**, v. 9, p. 91-102, 2018.

SATO, K., Food for Skin Health: Collagen Peptides. **Encyclopedia of Food Chemistry**, p. 1-5, 2018.

SANTOS, J.P., ESQUERDO, V.M., MOURA, C.M., PINTO, L.A. A. Crosslinking agents effect on gelatins from carp and tilapia skins and in their biopolymeric films. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, n.539, p.184-191, 2018.

SILA, A., MARTINEZ-ALVAREZ, O., KRICHEN, F., GÓMEZ-GUILLÉN, M.C., BOUGATEF, A. Gelatin prepared from European eel (*Anguilla anguilla*) skin: Physicochemical, textural, viscoelastic and surface properties. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, v.529, p.643-650, 2019.

SILVA, G.C.O., SILVA, S.S., CARVALHO, J.W.P., GUEDES, F.S., LOSS, R.A. Obtenção e Caracterização físico-química e microbiológica da gelatina de resíduos de matrinxã (*Brycon amazonicus*) e tambaqui (*Colossoma macropomum*). **Acta of fisheries and aquatic Resources**, v.6, n.1, p.74-84, 2018.

SILVA, E.V.C. **Otimização das condições de extração da gelatina de pele de peixes amazônicos por diferentes métodos**. 2016. 20f. Tese de doutorado (Programa de

Pós-graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos) - Instituto de Tecnologia, Universidade Federal do Pará, Belém-Pará, 2016.

SINTHUSAMRAN, S., BENJAKUL, S., SWEDLUND, P.J., HEMAR, Y. Physical and rheological properties of fish gelatin gel as influenced by  $\kappa$ -carrageenan. **Food Bioscience**, v.20, p.88-95, 2017.

SINTHUSAMRAN, S., BENJAKUL, S. Physical, rheological and antioxidant properties of gelatin gel as affected by their incorporation of  $\beta$ -glucan. **Food Hydrocolloids**, v.79, p.409-415, 2018.

SMITH, P.K. et al. Measurement of protein using bicinchoninic acid. **Analytical Biochemistry**, v.150, p.76-85, 1985.

STOHS, S.J., KITCHENS, E.K. Nutritional Supplementation in Health and Sports Performance. **Nutrition and Enhanced Sports Performance**, p.3-9, 2019.

SOW, L.C., NICOLE CHONG, J.M., LIAO, Q.X., YANG, H. Effects of  $\kappa$ -carrageenan on the structure and rheological properties of fish gelatin. **Journal of Food Engineering**, v.239, p.92-103, 2019.

SOW, L.C., YU TOH, N.Z., WONG, C.W., YANG, H. Combination of sodium alginate with tilapia fish gelatin for improved texture properties and nanostructure modification. **Food Hydrocolloids**, v.94, p.459-467, 2019.

SUI CHIN, S., HAN LYN, F., NUR HANANI, Z.A. Effect of Aloe vera (*Aloe barbadensis* Miller) gel on the physical and functional properties of fish gelatin films as active packaging. **Food Packaging and Shelf Life**, v.12, p.128-134, 2017.

SULTANA, S., ALI, M.E., AHAMAD, M.N.U. Gelatine, collagen, and single cell proteins as a natural and newly emerging food ingredients. **Preparation and Processing of Religious and Cultural Foods**, n.1, p.215-239, 2018.

SUN, L. et al. Nile tilapia skin collagen sponge modified with chemical cross-linkers as a biomedical hemostatic material. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 159, p. 89-96, 2017.

SUN, L., LI, B., SONG, W., SI, L., HOU, H. Characterization of Pacific cod (*Gadus macrocephalus*) skin collagen and fabrication of collagen sponge as a good biocompatible biomedical material. **Process Biochemistry**, v.63, p.229-235, 2019.

TAN, C.-C., KARIM, A.A., UTHUMPORN, U., GHAZALI, Farid C. Effect extraction temperature on the emulsifying properties of gelatin from Black tilapia (*Oreochromis mossambicus*) skin. **Food Hydrocolloids**, v.108, Artigo 106024, 2020.

TAYEL, A.A., GHANEM, R.A., MOUSSA, S.H., FAHMI, M., TARJAM, H.M., ISMAIL, N. Skin protectant textiles loaded with fish collagen, chitosan and oak galls extract composite.

**International Journal of Biological Macromolecules**, v.117, p.25-29, 2018.

TKACZEWSKA, J., BUKOWSKI, M., MAK, P. Identification of Antioxidant Peptides in Enzymatic Hydrolysates of Carp (*Cyprinus Carpio*) Skin Gelatin. **Molecules**, v.24, n.97, p.1-15, 2019.

ZHANG, Q., WANG, Q., LV, S., LU, J., JIANG, S., REGENSTEIN, J.M., LIN, L. Comparison of collagen and gelatin extracted from the skins of *Nile tilapia* (*Oreochromis niloticus*) and channel catfish (*Ictalurus punctatus*). **Food Bioscience**, v.13, p.41-48, 2016.

ZHANG, T., TU, Z., ZOU, Z., SHANGGUAN, X., WANG, H., BANSAL, N. Glycosylated fish gelatin emulsion: Rheological, tribological properties and its application as model coffee creamers. **Food Hydrocolloids**, v.102, 2020.

ZHANG, Z., ZHU, H., ZHENG, Y., ZHANG, L., WANG, X., LUO, Z., TANG, J., LIN, L., DU, Z., DONG, C. The effects and mechanism of collagen peptide and elastin peptide on skin aging induced by D-galactose combined with ultraviolet radiation. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v.210, p.1-8, 2020.

ZHANG, T., DING, M., TAO, L., LIU, L., TAO, N., WANG, X., ZHONG, J. Octenyl succinic anhydride modification of bovine bone and fish skin gelatins and their application for fish oil-loaded emulsions. **Food Hydrocolloids**, v.108, p.1-10, 2020.

ZHANG, T., SUN, R., DING, M., LI, L., TAO, N., WANG, X., ZHONG, J. Commercial cold-water fish skin gelatin and bovine bone gelatin: structural, functional, and emulsion stability differences. **LWT- Food Science and Technology**, v.125, 2020.

ZHAO, W.H. et al. Preparation, physicochemical and antioxidant properties of acid- and pepsin-soluble collagens from the swim bladders of miiuy croaker (*Miichthys miiuy*). **Marine Drugs**, v. 16, p. 12-19, 2018.

YOON, H.J., SHIN, S.R., CHA, J.M., LEE, S.-H., KIM, J.-H., DO, J.T., BAE, H. Cold Water Fish Gelatin Methacryloyl Hydrogel for Tissue Engineering Application. **PLoS ONE**, v.11 n. 10, Artigo e0163902, 2016.

WANDERLEY, M. C. A., NETO, J. M. W. D., LIMA, C. A., SILVERIO, S. I. C., FILHO, J.L. L. F., TEIXEIRA, J. A. C., PORTO, A. L. F. Production and Characterization of Collagenase by *Penicillium* sp. UCP 1286 Isolated From Caatinga Soil. *Journal of Applied Biology & Biotechnology*, v.4, n.4, p. 001-010, 2016.

WANG, B. et al. Isolation and characterization of collagen and antioxidant collagen peptides from scales of croceine croaker (*Pseudosciaena crocea*). **Marine Drugs**, v. 11, p. 4641-4661, 2013.

XU, L. et al. Effect of marine collagen peptides on physiological and neurobehavioral development of male rats with perinatal asphyxia. **Marine drugs**, v. 13, p. 3653-3671, 2015.



## SÚMULA CURRICULAR

- Curso de extensão em proteínas de organismos aquáticos e suas aplicações; Fisiológicas, das palestras aplicações fisiológicas de proteínas de organismos aquáticos;
- Projeto de extensão: Quiz metabólico: aprendendo bioquímica e fisiologia no ensino fundamental através de jogos de perguntas e respostas;
- Capítulo de livro: “Rejeitos de peixes cultivados e o desafio da sustentabilidade”;
- Capítulo de livro: “Ondas ultrassônicas auxiliando no particionamento de proteases residuais de tainha (*Mugil liza*)”;
- Capítulo de livro: Mini-revisão sobre os carotenoides: conceitos , fontes e atividades biológicas;
- Capítulo de livro: Possibilidades proteicas do processamento agroindustrial de peixes;
- Capítulo de livro: Pré-purificação de protease colagenolítica de fígado e mistura de vísceras de tambaqui (*Colossoma macropomum*) usando precipitação com solventes orgânicos;
- Recuperação de protease ácida termoestável de Apaiari (*Astronatus ocellatus*);
- Do lixo para a indústria: Recuperação de enzimas colagenolíticas obtidas a partir de resíduos intestinais de peixes para a aplicação industrial;
- Vísceras de (*Lycengraulis batesu*) e (*Caranx cryspus*) como fonte de proteases de interesse biomédico;
- Capítulo de livro: Dosagem de proteínas totais de peixes e crustáceos;
- Capítulo de livro: Produção de gelatina de subprodutos de peixes;
- Capítulo de livro: Atividade de proteases inespecíficas de peixes e crustáceos e moluscos;
- Artigo: From Waste the industry: Recovery of collagenolytic enzymes obtained from the fish intestinal residues for insdustrial application;
- Capítulo de livro: Vísceras de peixes como matéria-prima para extração de proteases com atividade colagenolítica;

- Capítulo de livro: Matéria-prima da pesca e aquicultura com potencial para tratamento do covid-19;
- Capítulo de livro: Subprodutos da avicultura e piscicultura; Novas estratégias bioativas para o combate a covid-19.
- Organização de eventos: II curso de inverno em Biociências
- Organização de eventos: II Webinar de biotecnologia aplicada a pesca e Aquicultura (II WBAPA)
- Participação no livro: Fungos e bactérias de importância agrícola utilizados no controle biológico: uma prospecção científica. 1. Ed. Rfb editora, 2021.

## ANEXO A – Certificados






MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO  
**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO**  
 Pró-Reitoria de Extensão, Cultura e Cidadania




## Certificado

Certificamos que **Jessica Costa da Silva** participou do(a) curso "Curso de Extensão em Proteínas de Organismos Aquáticos e Suas Aplicações Fisiológicas", das palestras Aplicações fisiológicas de proteínas de organismos aquáticos, cadastrado no edital SÔNUS 2019, coordenado por Ana Lúcia Figueiredo Porto, na qualidade de palestrante, do dia 27 de maio até 07 de junho de 2019, perfazendo uma carga horária total de 24 horas.

Recife, 12 de abril de 2021

  
 Moisés de Melo Santana  
 Pró-Reitor de Extensão, Cultura e  
 Cidadania

  
 Marcos Antonio B. Figueiredo  
 Coordenador de Educação Continuada




MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO  
**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO**  
 Pró-Reitoria de Extensão, Cultura e Cidadania




## Certificado

Certificamos que **Jessica Costa da Silva** participou do(a) projeto "Quiz metabólico: aprendendo bioquímica e fisiologia no ensino fundamental através de jogos de perguntas-respostas", cadastrado no edital SÔNUS 2019, coordenador por Ana Lúcia Figueiredo Porto, na qualidade de Colaborador(a), do dia 01 de julho a 31 de outubro de 2019, perfazendo uma carga horária total de 120 horas.

Recife, 31 de março de 2021

  
 Moisés de Melo Santana  
 Pró-Reitor de Extensão, Cultura e  
 Cidadania

  
 Marcos Antonio B. Figueiredo  
 Coordenador de Educação Continuada







### CERTIFICADO

Certificamos que **JULYANNE VICTÓRIA DOS SANTOS FERREIRA, JÉSSICA COSTA DA SILVA, NILSON FERNANDO BARBOSA DA SILVA, ANA LÚCIA FIGUEIREDO PORTO, VAGNE MELO OLIVEIRA**, participaram do **II CONGRESSO INTERNACIONAL DA AGROINDÚSTRIA - CIAGRO 2021 ISSN**, evento realizado de forma **ONLINE**, no período de 10 a 11 de Junho de 2021, na qualidade de **AUTORES DO TRABALHO: MINI-REVISÃO SOBRE OS CAROTENOIDES: CONCEITOS, FONTES E ATIVIDADES BIOLÓGICAS** na modalidade **ARTIGO DE REVISÃO** tendo sido apresentado e publicado no Anais do Evento, promovido pelo **INSTITUTO INTERNACIONAL DESPERTANDO VOCAÇÕES - IIDV**.

INSTITUTO  
INTERNACIONAL  
DESPERTANDO  
VOCAÇÕES:3056  
6127000133

Assinado de forma  
digital por INSTITUTO  
INTERNACIONAL  
DESPERTANDO  
VOCAÇÕES:30566127  
000133  
Dados: 2021.06.13  
23:05:50 -03'00'

**Drª Anny Kelly Vasconcelos de Oliveira Lima**  
Coordenadora Geral do CIAGRO 2021

**Drª Acenini Lima Balieiro**  
Coordenadora da Comissão Científica

**Prof.ª Dr.ª Kilma da Silva Lima Viana**  
Presidente do IIDV



CÓDIGO DE REGISTRO DE CERTIFICADO:

3EAF64C7B58901C8CC559D48C7C358BA2D46A6

Para confirmação de autenticidade de registro do documento acesse: [certificados.institutoidv.org](https://certificados.institutoidv.org)



### CERTIFICADO

Certificamos que **JESSICA COSTA DA SILVA, SÉRGIO LUCAS NUNES DO NASCIMENTO, BEATRIZ DE AQUINO MARQUES DA COSTA, ANA LÚCIA FIGUEIREDO PORTO, VAGNE MELO OLIVEIRA**, participaram do **II CONGRESSO INTERNACIONAL DA AGROINDÚSTRIA - CIAGRO 2021 ISSN**, evento realizado de forma **ONLINE**, no período de 10 a 11 de Junho de 2021, na qualidade de **AUTORES DO TRABALHO: POSSIBILIDADES PROTEICAS DO PROCESSAMENTO AGROINDUSTRIAL DE PEIXES** na modalidade **ARTIGO DE REVISÃO** tendo sido apresentado e publicado no Anais do Evento, promovido pelo **INSTITUTO INTERNACIONAL DESPERTANDO VOCAÇÕES - IIDV**.

INSTITUTO  
INTERNACIONAL  
DESPERTANDO  
VOCAÇÕES:3056  
6127000133

Assinado de forma  
digital por INSTITUTO  
INTERNACIONAL  
DESPERTANDO  
VOCAÇÕES:30566127  
000133  
Dados: 2021.06.13  
23:05:50 -03'00'

**Drª Anny Kelly Vasconcelos de Oliveira Lima**  
Coordenadora Geral do CIAGRO 2021

**Drª Acenini Lima Balieiro**  
Coordenadora da Comissão Científica

**Prof.ª Dr.ª Kilma da Silva Lima Viana**  
Presidente do IIDV



CÓDIGO DE REGISTRO DE CERTIFICADO:

01D11C86952D828645C1A3452A7676349837A18

Para confirmação de autenticidade de registro do documento acesse: [certificados.institutoidv.org](https://certificados.institutoidv.org)

## CAPÍTULO 07

Pré-purificação de proteases colagenolíticas de fígado e mistura de vísceras de tambaqui (*Colossoma macropomum*) usando precipitação com solventes orgânicos.

### Julyanne Victória dos Santos Ferreira

Graduanda em Licenciatura plena em Ciências biológicas, pela Universidade Federal Rural de Pernambuco- UFRPE

Instituição: Laboratório de Tecnologia de Bioativos-LABTECBIO

Endereço: Rua Dom Manuel de Medeiros, S/N - Dois irmãos - Recife- PE, CEP: 52171-900

E-mail: julyanne.marculino@gmail.com

### Jessica Costa da Silva

Mestre em Ciências Biológicas pela Universidade Federal de Pernambuco- UFPE

Instituição: Laboratório de Tecnologia de Bioativos-LABTECBIO

Endereço: Rua Dom Manuel de Medeiros, S/N - Dois irmãos - Recife- PE, CEP: 52171-900

E-mail: jess.cost15@gmail.com

### Nilson Fernando Barbosa da Silva

Graduando em Engenharia de Pesca, pela Universidade Federal Rural de Pernambuco- UFRPE

Instituição: Laboratório de Tecnologia de Bioativos-LABTECBIO

Endereço: Rua Dom Manuel de Medeiros, S/N - Dois irmãos - Recife- PE, CEP: 52171-900

E-mail: nilsons.fernando@gmail.com

### Beatriz de Aquino Marques da Costa

Bióloga pela Universidade Federal Rural de Pernambuco- UFRPE

Instituição: Laboratório de Tecnologia de Bioativos-LABTECBIO

Endereço: Rua Dom Manuel de Medeiros, S/N - Dois irmãos - Recife- PE, CEP: 52171-900

E-mail: daquinobeatriz@gmail.com

### Quesia Jemina da Silva

Mestre em Ciência e Tecnologia de Alimentos pela Universidade Federal Rural de Pernambuco- UFRPE

Instituição: Laboratório de Tecnologia de Bioativos-LABTECBIO

Endereço: Rua Dom Manuel de Medeiros, S/N - Dois irmãos - Recife- PE, CEP: 52171-900

E-mail: quesiajemina0@gmail.com

### Sabrina Roberta Santana da Silva

Doutora em biociência animal pela Universidade Federal Rural de Pernambuco- UFRPE

Instituição: Laboratório de Tecnologia de Bioativos-LABTECBIO

Endereço: Rua Dom Manuel de Medeiros, S/N - Dois irmãos - Recife- PE, CEP: 52171-900

E-mail: Sabrina\_santanas@yahoo.com.br

**Ana Lúcia Figueiredo Porto**

Doutora em engenharia química pela UNICAMP Instituição: Laboratório de Tecnologia de Bioativos- UFRPE

Endereço: Rua Dom Manuel de Medeiros, S/N - Dois irmãos - Recife- PE, CEP: 52171-900

E-mail: analuporto@yahoo.com.br

**Vagne de Melo Oliveira**

Doutorado em Ciências Biológicas pela Universidade Federal de Pernambuco-UFPE Instituição: Laboratório de Tecnologia de Bioativos-UFRPE

Endereço: Rua Dom Manuel de Medeiros, S/N - Dois irmãos - Recife- PE, CEP: 52171-900

E-mail: vagne\_melo@hotmail.com

**RESUMO:** Proteases são enzimas que realizam clivagens hidrolíticas de ligações peptídicas das proteínas, sendo as proteases colagenolíticas de fundamental importância devido ao potencial uso em produtos farmacêuticos, por possuir propriedades terapêuticas na cicatrização de feridas, queimaduras e no tratamento de algumas doenças, incluindo hérnia de disco intervertebral, quelóide e celulite. Sendo assim, este estudo buscou a obtenção de proteases colagenolíticas a partir de resíduos digestivos (fígado e mistura de vísceras-Mix) de exemplares de tambaqui (*Colossoma macropomum*) usando precipitação com solventes orgânicos. As vísceras foram, separadamente, trituradas, maceradas, homogeneizadas e centrifugadas para produção do extrato bruto enzimático. Em seguida, o extrato foi pré-purificado usando solventes orgânicos (acetona e etanol) na concentração de 25 %. Os resultados indicaram maior atividade colagenolítica no material de fígado e na mistura de vísceras (194,5 e 399,5 U/ml, respectivamente). Assim, foram recuperadas com sucesso proteases com propriedades colagenolíticas, sinalizando a potencialidade de vísceras de tambaqui como fonte dessa biomolécula.

**PALAVRAS-CHAVE:** Proteases, resíduos, tambaqui.

**ABSTRACT:** Proteases are enzymes that perform hydrolytic cleavages of protein peptide bonds, with collagenolytic proteases of fundamental importance due to their potential use in pharmaceutical products, as they have therapeutic properties in wound healing, burns and in the treatment of some diseases, including intervertebral disc herniation, keloid and cellulite. Thus, this study sought to obtain collagenolytic proteases from digestive residues (liver and mix of viscera-Mix) from specimens of tambaqui (*Colossoma macropomum*) using precipitation with organic solvents. The viscera were separately crushed, macerated, homogenized and centrifuged to produce the crude enzyme extract. Then, the extract was pre-purified using organic solvents (acetone and ethanol) at a concentration of 25 %. The results indicated greater collagenolytic activity in the liver material and in the viscera mixture (194,5 and 399,5 U/ml, respectively). Thus, proteases with collagenolytic properties were successfully recovered, signaling the potential of tambaqui viscera as a source of this biomolecule.

**KEYWORDS:** Proteases, residues, tambaqui.



## CAPÍTULO 11

### Recuperação de protease ácida termoestável de apaiari (*Astronotus ocellatus*)

**Luiz Henrique Svintiskas Lino**

Bacharel em Ciências Biológicas

Instituição: Universidade Federal de Pernambuco/UFPE

Endereço: Av. Prof. Moraes Rego, 1235 - Cidade Universitária, Recife - PE, CEP: 50670-901

E-mail: luiz.svintiskas@hotmail.com

**Beatriz de Aquino Marques da Costa**

Bacharel em Ciências Biológicas

Instituição: Universidade Federal Rural de Pernambuco/UFRPE

Endereço: Rua Dom Manuel de Medeiros, s/n, Dois Irmãos, Recife, Pernambuco, CEP: 52171-900

E-mail: deaquinobeatriz@gmail.com

**Nilson Fernando Barbosa da Silva**

Graduando em Engenharia de Pesca

Instituição: Universidade Federal Rural de Pernambuco/UFRPE

Endereço: Rua Dom Manuel de Medeiros, s/n, Dois Irmãos, Recife, Pernambuco, CEP: 52171-900

E-mail: nilsons.fernando@gmail.com

**Quesia Jemima da Silva**

Mestre em Ciências e Tecnologia de Alimentos Instituição: Universidade Federal de Pernambuco

Endereço: Rua Dom Manoel de Medeiros s/n, Bairro: Dois Irmãos - Recife, PE, CEP: 52.171-900

E-mail: quesiajemima0@gmail.com

**Jessica Costa da Silva**

Mestre em Ciências Biológicas, pela Universidade Federal de Pernambuco

Instituição: Universidade Federal Rural de Pernambuco/UFRPE

Endereço: Rua Dom Manoel de Medeiros s/n, Bairro: Dois Irmãos - Recife, PE, CEP: 52.171-900

E-mail: jess.cost15@gmail.com

**Vagne de Melo Oliveira**

Doutor em Ciências Biológicas, pela Universidade Federal de Pernambuco

Instituição: Universidade Federal Rural de Pernambuco/UFRPE

Endereço: Rua Dom Manoel de Medeiros s/n, Bairro: Dois Irmãos - Recife, PE, CEP: 52.171-900

E-mail: vagne\_melo@hotmail.com

**Douglas Henrique de Holanda Andrade**

Doutor em Bioquímica e Fisiologia

Instituição: Universidade Federal de Pernambuco/UFPE

Endereço: Rua Dom Manoel de Medeiros s/n, Dois Irmãos - Recife, PE, CEP:  
52.171-900  
E-mail: vagne\_melo@hotmail.com

**Ana Lúcia Figueiredo Porto**

Doutora em Engenharia Química

Instituição: Universidade Federal Rural de Pernambuco

Endereço: Rua Dom Manoel de Medeiros s/n, Dois Irmãos - Recife, PE, CEP:  
52.171-900

E-mail: analuporto@yahoo.com.br

**RESUMO:** O aumento da produção e consumo de peixes têm gerado uma grande quantidade de resíduos sólidos: ossos, pele, escamas e vísceras digestivas (intestino, fígado, estômago). Com o intuito de aproveitar esses subprodutos, são extraídas diversas biomoléculas, entre elas, a collagenase, enzima capaz de clivar o colágeno. O objetivo deste trabalho foi selecionar e extrair enzimas collagenolíticas a partir de resíduos de peixes como potencial para aplicação biotecnológica. O material biológico das espécies em estudo passou pelos processos de separação, maceração e homogeneização. O de robalo-flecha (*Centropomus undecimalis*) ( $102,41 \pm 0,00$  U/mg) foi a espécie que apresentou maior atividade collagenolítica dentre as demais espécies: anchova (*Pomatomus saltatrix*) ( $82,24 \pm 0,00$  U/mg), xixarro amarelo (*Caranx bartholomaei*) ( $26,66 \pm 0,00$  U/mL), pampo (*Trachinotus carolinus*) ( $89,00 \pm 0,07$  U/mg), tambaqui (*Colossoma macropomum*) ( $78,23 \pm 0,00$  U/mg) e tilápia-do-Nilo (*Oreochromis niloticus*) ( $81,96 \pm 0,01$  U/mg). A partir desses resultados observou-se que o robalo-flecha (*C. undecimalis*) apresenta um possível potencial para aplicação biotecnológica, aumento do lucro das indústrias de pescados, além de reduzir o descarte inadequado ao meio ambiente.

**PALAVRAS-CHAVE:** Biotecnologia, enzima, peixes, subprodutos.

**ABSTRACT:** The increase in fish production and consumption has generated a large amount of waste: bones, skin, scales and digestive viscera (intestine, liver, stomach). In order to take advantage of these by-products, several biomolecules are extracted, including collagenase, an enzyme capable of hydrolyzing collagen. The biological material of the species under study went through the processes of separation, maceration and homogenization. The objective of this work was to recover collagenolytic enzymes obtained from intestinal fish residues for industrial application. The biological material of the species under study went through the processes of separation, maceration and homogenization. The species of sea bass (*C. undecimalis*) ( $102.41 \pm 0.00$  U/mg) was the species that showed greater collagenolytic activity among the other species: anchovy (*Pomatomus saltatrix*) ( $82.24 \pm 0.00$  U/mg), yellow xix (*Caranx bartholomaei*) ( $26.66 \pm 0.00$  U/mL), pampo (*Trachinotus carolinus*) ( $89.00 \pm 0.07$  U/mg), tambaqui (*Colossoma macropomum*) ( $78.23 \pm 0.00$  U/mg) and Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) ( $81.96 \pm 0.01$  U/mg). From these results it was observed that sea bass (*C. undecimalis*) has a potential for biotechnological application, increased profit from the fish industries, in addition to reducing inappropriate disposal to the environment.

**KEYWORDS:** Biotechnology, enzyme, fish, by-products.

## CAPÍTULO 24

Do lixo para a indústria: recuperação de enzimas collagenolíticas obtidas a partir de resíduos intestinais de peixes para aplicação industrial

Mestre em Ciências Biológicas

Instituição: Universidade Federal Rural de Pernambuco

Endereço: Rua Dom Manoel de Medeiros s/n, Dois Irmãos - Recife, PE

CEP: 52.171-900

E-mail: jess.cost15@gmail.com

Julyanne Victória dos Santos Ferreira

Graduanda em Ciências Biológicas/Licenciatura Instituição: Universidade Federal Rural de Pernambuco

Endereço: Rua Dom Manoel de Medeiros s/n, Dois Irmãos - Recife, PE

CEP: 52.171-900

E-mail: juhh.victoria@gmail.com

Nilson Fernando Barbosa

Graduando em Engenharia de Pesca

Endereço: Rua Dom Manoel de Medeiros s/n, Dois Irmãos - Recife, PE

CEP: 52.171-900

E-mail: nilsons.fernando@gmail.com

Beatriz de Aquino Marques Costa

Bacharel em Ciências Biológicas

Instituição: Universidade Federal Rural de Pernambuco

Endereço: Rua Dom Manoel de Medeiros s/n, Dois Irmãos - Recife, PE

CEP: 52.171-900

E-mail: deaquinobeatriz@gmail.com

Quesia Jemima da Silva

Mestre em Ciências e Tecnologia de Alimentos

Instituição: Universidade Federal Rural de Pernambuco

Endereço: Rua Dom Manoel de Medeiros s/n, Dois Irmãos - Recife, PE

CEP: 52.171-900

E-mail: quesiajemima0@gmail.com

Sabrina Roberta Santana da Silva

Doutora em Biociência Animal

Instituição: Universidade Federal Rural de Pernambuco

Endereço: Rua Dom Manoel de Medeiros s/n, Dois Irmãos - Recife, PE

CEP: 52.171-900

E-mail: sabrina\_santanas@yahoo.com.br

Vagne de Melo Oliveira

Doutor em Ciências Biológicas

Instituição: Universidade Federal Rural de Pernambuco

Endereço: Av. Prof. Moraes Rego, 1235 - Cidade Universitária, Recife - PE, CEP: 50670-901  
E-mail: douglasvicencia@gmail.com

Ranilson de Souza Bezerra

Doutor em Ciências Biológicas

Instituição: Universidade Federal de Pernambuco/UFPE

Endereço: Av. Prof. Moraes Rego, 1235 - Cidade Universitária, Recife - PE, CEP: 50670-901

E-mail: ransoube@uol.com.br

**RESUMO:** Dentre as espécies de peixes com potencial comprovado para a piscicultura, destaca-se o *Astronotus ocellatus*, conhecida como Apaiari, nativa da região Amazônica, porém encontra-se disseminada em quase todo o Brasil. Existe ainda uma enorme lacuna no que diz respeito aos conhecimentos acerca de suas necessidades nutricionais. Dessa forma, o presente estudo objetivou investigar e avaliar termicamente uma protease ácida de *A. ocellatus*. Para tanto, foram adquiridas vísceras de exemplares adultos, as quais seriam descartadas no ambiente. O material foi coletado com pescadores no município de Paulo Afonso-BA. Os tecidos estomacais foram homogeneizados para obter o extrato bruto (EB). Foi realizada a atividade do EB com hemoglobina bovina a 2 %, e em seguida o extrato foi exposto a diferentes temperaturas. A atividade proteolítica do EB resultou em  $7,4 \pm 0,01$  U/mg, foi obtido a temperatura ótima de 55° C, também a enzima se manteve estável até 40° C. O resultado obtido neste trabalho evidenciou atividade de enzimas do tipo pepsina no extrato bruto de *A. ocellatus* e também sua temperatura ótima de funcionamento. A pepsina tem um papel fundamental na digestão de proteínas e os resultados aqui descritos fornecem informações importantes para a compreensão da fisiologia digestiva e o desenvolvimento de uma gestão adequada no processo de cultivo da espécie.

**PALAVRAS-CHAVE:** piscicultura, proteases ácidas, pepsina.

**ABSTRACT:** Among the species of fish with proven potential for fish farming, *Astronotus ocellatus*, known as Apaiari, native to the Amazon region, stands out, but it is disseminated in almost all of Brazil. There is still a huge gap in terms of knowledge about your nutritional needs. Thus, the present study aimed to investigate and thermally evaluate an acid protease from *A. ocellatus*. For this purpose, adult specimens were acquired, which would be discarded in the environment. The material was collected from fishermen in the city of Paulo Afonso - BA. The stomach tissues were homogenized to obtain the crude extract (EB). EB activity was performed with 2% bovine hemoglobin, and then the extract was exposed to different temperatures. The proteolytic activity of EB resulted in  $7.4 \pm 0.01$  U/mg, an optimal temperature of 55°C was obtained, also the enzyme remained stable up to 40°C. The result obtained in this work showed activity of enzymes of the type pepsin in the crude extract of *A. ocellatus* and also its optimum temperature of operation. Pepsin has a fundamental role in the digestion of proteins and the results described here provide important information for the understanding of digestive physiology and the development of an adequate management in the process of cultivation of the species.

**KEYWORDS:** Fish farming, acid proteases, pepsin.

## CAPÍTULO 25

### Vísceras de *Lycengraulis batesii* e *Caranx crysos* como fonte de proteases de interesse biomédico

Quésia Jemima da Silva

Mestre em Ciência e Tecnologia de Alimentos/UFRPE Instituição: Universidade Federal Rural de Pernambuco/UFRPE

Endereço: Rua Dom Manuel de Medeiros, s/n - Dois Irmãos, Recife - PECEP: 52171-900

E-mail: [quesiajemima0@gmail.com](mailto:quesiajemima0@gmail.com)

Jessica Costa da Silva

Mestre em Ciências Biológicas/UFPE

Instituição: Universidade Federal Rural de Pernambuco/UFRPE Endereço: Rua Dom Manuel de Medeiros, s/n - Dois Irmãos, Recife - PECEP: 52171-900

E-mail: [jess.cost15@gmail.com](mailto:jess.cost15@gmail.com)

Beatriz de Aquino Marques da Costa

Bióloga/UFRPE

Instituição: Universidade Federal Rural de Pernambuco/UFRPE Endereço: Rua Dom Manuel de Medeiros, s/n - Dois Irmãos, Recife - PECEP: 52171-900

E-mail: [desquinobeatriz@gmail.com](mailto:desquinobeatriz@gmail.com)

Luiz Henrique Svintiskas Lino

Biólogo/UFPE

Instituição: Universidade Federal de Pernambuco

Endereço: Av. Prof. Moraes Rego, 1235 - Cidade Universitária, Recife - PECEP: 50670-901

E-Vagne de Melo Oliveira

mail: [luiz.svintiskas@hotmail.com](mailto:luiz.svintiskas@hotmail.com)

Vagne de Melo Oliveira

Doutor em Ciências Biológicas, pela Universidade Federal de Pernambuco

Instituição: Universidade Federal Rural de Pernambuco/UFRPE

Endereço: Rua Dom Manoel de Medeiros s/n, Bairro: Dois Irmãos - Recife, PECEP: 52.171-900

E-mail: [vagne\\_melo@hotmail.com](mailto:vagne_melo@hotmail.com)

Ana Lúcia Figueiredo Porto

Profª Titular da Universidade Federal Rural de Pernambuco/UFRPE Instituição: Universidade Federal Rural de Pernambuco/UFRPE

Endereço: Rua Dom Manoel de Medeiros s/n, Bairro: Dois Irmãos - Recife, PECEP: 52.171-900

E-mail: [analuporto@yahoo.com.br](mailto:analuporto@yahoo.com.br)

**RESUMO:** Visceras de peixes são consideradas como uma fonte rica de proteínas e enzimas de qualidade e estas podem se tornar produtos finais de alto valor biológico quando extraídos de forma adequada, como as collagenases, que são as proteases com capacidade de degradar os vários tipos de colágenos e estão presentes em tratos digestivos de pescados. Desta forma, o objetivo deste estudo foi avaliar a atividade collagenolítica visceral de duas espécies de peixes marinhos, *Lycengraulis batesii* e *Caranx crysos*. Para tanto, as vísceras foram higienizadas, maceradas, homogeneizadas e centrifugadas para produção do extrato bruto enzimático. O teor de proteínas totais do arenque e guarajuba foi de 4,52 e 3,54 mg/ml, respectivamente, enquanto a atividade collagenolítica volumétrica foi de 313,9 e de 132,25 U/ml, respectivamente. Assim, as vísceras de ambas as espécies se apresentaram como forma promissora para extração de enzimas de interesse biomédico.

**PALAVRAS-CHAVE:** Resíduo pesqueiro, biotecnologia, enzimas, proteínas.

**ABSTRACT:** Fish offal is considered to be a rich source of quality proteins and enzymes and these can become end products of high biological value when properly extracted, such as collagenases, which are proteases capable of degrading the various types of collagen and are present in digestive tracts of fish. Thus, the aim of this study was to evaluate the visceral collagenolytic activity of two species of marine fish, *Lycengraulis batesii* and *Caranx crysos*. Therefore, the viscera were cleaned, macerated, homogenized and centrifuged to produce the crude enzyme extract. The total protein content of herring and guarajuba was 4.52 and 3.54 mg/ml, respectively, while the volumetric collagenolytic activity was 313.9 and 132.25 U/ml, respectively. Thus, the viscera of both species presented themselves as a promising way to extract enzymes of biomedical interest.

**KEYWORDS:** Fishing waste, biotechnology, enzymes, proteins.





# DOSAGEM DE PROTEÍNAS TOTAIS DE SUBPRODUTOS DO PESCADO

## AUTORES

Vagne de Melo Oliveira  
Jessica Costa da Silva  
Beatriz de Aquino Marques da Costa  
Caio Rodrigo Dias Assis  
Juliana Ferreira dos Santos  
Ana Lúcia Figueiredo Porto

---

## CAPÍTULO 3

### RESUMO

Proteínas são macromoléculas biológicas de importância vital para o organismo. Além das funções biológicas, as proteínas tem sido alvo constante da indústria por apresentarem aplicações biotecnológicas das mais variadas nos diversos segmentos (alimentício, biomédico, farmacêutico, têxtil, curtume, terapêutico, entre outros). Fontes de proteínas de alta qualidade, o pescado tem sido considerado uma matéria-prima valiosa e de baixo custo, principalmente no uso de seus descartes (resíduos sólidos orgânicos). A quantificação das proteínas totais presentes numa amostra de pescado é o primeiro passo para identificação de sua potencialidade. Vários métodos espectrofotométricos têm sido utilizados visando essa finalidade, destacando-se: método de Lowry, método de Bradford, método do Ácido bicinonínico-BCA ou de Smith e detecção por absorção de ultravioleta-UV. Diversos fatores devem ser levados em consideração na escolha do método de quantificação de proteínas totais, devendo-se observar: tipo de amostra, concentração da amostra, custo, a rapidez, sensibilidade e os possíveis interferentes.

Palavras-chave: técnicas, espectrofotometria, proteínas totais, resíduos.

### ABSTRACT

Proteins are biological macromolecules of vital importance for the organism. In addition to biological functions, proteins have been a constant target of the industry for presenting diverse biotechnological applications in various segments (food, biomedical, pharmaceutical, textile, tannery, therapeutic, among others). High quality protein sources, fish has been considered a valuable and low-cost raw material, mainly in the use of its discards (solid organic waste). The quantification of the total proteins present in a fish sample is the first step to identify its potential. Several spectrophotometric methods have been used for this purpose, notably: Lowry method, Bradford method, Bicinchoninic acid-BCA or Smith method and detection by ultraviolet-UV absorption. Several factors must be considered when choosing the method of quantification of total proteins: type of sample, concentration of the sample, the cost, speed, sensitivity and the possible interferents must be observed.

Keywords: techniques, spectrophotometry, total proteins, residues.





# ATIVIDADE COLAGENOLÍTICA DE PEIXES E CRUSTÁCEOS

AUTORES

Vagne de Melo Oliveira

Beatriz de Aquino Marques da Costa

Jessica Costa da Silva

Ana Lúcia Figueiredo Porto



## CAPÍTULO 5

### RESUMO

As collagenases são enzimas capazes de clivar a tripla hélice do colágeno, sendo altamente desejada no segmento terapêutico para tratamento de feridas e queimaduras, cicatrizações e procedimentos pós-operatórios, entre outros. As collagenases podem ser obtidas a partir de fontes microbianas, vegetais e animais. As collagenases utilizadas comumente na indústria são as de origem bacterianas e fúngicas. Todavia, o alto custo para produção e purificação a partir dessas fontes tem gerado uma busca por matéria-prima alternativa, como os resíduos de pescado. Visceras de peixes e resíduos de crustáceos são fontes potenciais para a obtenção de biomoléculas collagenolíticas. Através de etapas sistemáticas para produção do extrato bruto enzimático collagenolítico, é possível obter rapidamente a protease para aplicações biotecnológicas. Dentre as proteases que apresentam atividade collagenolítica estão a tripsina e a quimotripsina, ambas serino-proteases. Existe uma variedade de protocolos para a extração e purificação de enzimas com propriedades collagenolíticas obtidas a partir de vísceras intestinais de espécies de peixes Tropicais e Neotropicais, incluindo técnicas simples até métodos mais avançados.

Palavras-chave: enzimas, proteases collagenolíticas, resíduos, vísceras digestivas.

### ABSTRACT

Collagenases are enzymes capable of cleaving the triple helix of collagen, being highly desired in the therapeutic segment for the treatment of wounds and burns, scarring and postoperative procedures, among others. Collagenases can be obtained from microorganism, plant, or animal sources. The most commonly used collagenase in the industry are the ones from bacterial and fungal origin. However, the high cost of production and purification from these sources have generated the search for alternative sources, such as fish residues. Fish viscera and crustacean residues are potential sources for the obtention of collagenolytic biomolecules. Through systematic steps for the production of collagenolytic enzymatic crude extract, it is possible to rapidly obtain protease biotechnological applications. Trypsin and chymotrypsin are among the proteases that present collagenolytic activity, both are serine proteases. There are various protocols for the extraction and purification of enzymes with collagenolytic properties obtained from intestinal viscera from Tropical and Neotropical fish species, including simple techniques or more advanced methods.

Keywords: enzymes, collagenolytic proteases, residue, digestive viscera.





# PRODUÇÃO DE GELATINA DE SUBPRODUTOS DE PEIXES

## AUTORES

Vagne de Melo Oliveira  
Jessica Costa da Silva  
Ana Lúcia Figueiredo Porto

## CAPÍTULO 6

### RESUMO

As gelatinas são misturas de diferentes compostos conhecidos como cadeias  $\alpha$ , cadeias  $\beta$  e cadeias  $\gamma$ , obtidas a partir da hidrólise parcial do colágeno sob diferentes condições (ácidas, alcalis, enzimáticas e altas temperaturas). Ainda, faz parte da composição os sais e água. As principais fontes dessa matéria-prima são as provenientes de mamíferos (suínos e bovinos), porém restrições sanitárias, socioculturais e religiosas são fatores limitantes. Como substituto eventual, as vísceras de peixes têm sido cada vez mais utilizadas como matéria-prima (peles, escamas, carcaça, ossos e até a bexiga natatória). As características e propriedades físico-químicas e reológicas da gelatina extraída e produzida de peixes têm favorecido sua utilização no âmbito industrial (alimentício e terapêutico). A produção de gelatina é realizada em passos sistemáticos que objetivam otimizar sua produção e a obtenção de um produto de qualidade e apto para uso comercial.

Palavras-chave: biopolímero, gelatina, proteína, resíduos.

### ABSTRACT

Gelatins are a mixture of different compounds known as  $\alpha$  chains,  $\beta$  chains and  $\gamma$  chains, obtained from partial hydrolysis of collagen under different conditions (acid, alkali, enzymatic and high temperature). Also, salts and water are part of the structure. The main sources of this raw material are the ones from mammals (porcine and bovine), but sanitary, sociocultural and religious restrictions are limiting factors. As an eventual substitute, fish viscera have been increasingly used as source material (skin, scales, carcass, bones and swimming bladder). The physicochemical and rheological characteristics and properties of gelatin extracted and produced from fish have favored its use in the industrial segment (food and therapeutic products). The production of gelatin is performed in systematic steps that aim to optimize its production and the obtention of a quality product that is apt for commercial use.

Keywords: biopolymer, gelatin, protein, residues.





# ATIVIDADE DE PROTEASES INESPECÍFICAS DE PEIXES, CRUSTÁCEOS E MOLUSCOS

AUTORES

Vagne de Melo Oliveira  
Jessica Costa da Silva  
Nairane da Silva Rosa Leão  
Sabrina Roberta Santana da Silva  
Ana Lúcia Figueiredo Porto

---

## CAPÍTULO 8

### RESUMO

As proteases são um conjunto de enzimas com a capacidade de clivar proteínas, sendo o grupo de enzimas de maior interesse industrial. Proteases podem ser obtidas de fontes vegetais, microbianas e animais. Proteases extraídas, purificadas e caracterizadas a partir de resíduos de organismos aquáticos tem sido cada vez mais utilizadas no mercado global de proteases. A partir do processamento do pescado, é possível obter pepsina, tripsina, quimotripsina, collagenases, enzimas fibrinolíticas, entre outras. O primeiro passo para sua determinação é a preparação do extrato bruto enzimático da víscera-alvo de peixes, crustáceos e/ou moluscos. O ensaio propriamente dito para determinação de proteases inespecíficas foi adaptado por Azevedo e colaboradores (2003) para realização em microplaca e utiliza a azocaseína como substrato, sendo considerado um método rápido, fácil e econômico de investigar a presença desse grupo de enzimas em extratos brutos enzimáticos ou em materiais purificados.

**Palavras-chave:** proteases inespecíficas, resíduos, vísceras digestivas.

### ABSTRACT

Proteases are a set of enzymes with the capacity to cleave proteins, being the group of enzymes with the biggest industrial interest. Proteases can be obtained from plant, microorganism or animal sources. Proteases that are extracted, purified and characterized from residues of aquatic organisms have been increasingly used in the global protease market. From the processing of fish, it is possible to obtain pepsin, trypsin, chymotrypsin, collagenases, fibrinolytic enzymes, among others. The first step to their determination is the preparation of the enzymatic crude extract from the target viscera of fish, crustaceans and/or mollusks. The essay for the determination of nonspecific proteases was adapted by Azevedo and collaborators (2003) for microplate and uses azocasein as substrate, being considered a fast, easy and economic method of investigating the presence of this group of enzymes in enzymatic crude extracts or in purified materials.

**Keywords:** nonspecific proteases, residue, digestive viscera.



**Do lixo para a indústria: recuperação de enzimas colagenolíticas obtidas a partir de resíduos intestinais de peixes para aplicação industrial**

**From waste to the industry: recovery of collagenolytic enzymes obtained from fish intestinal residues for industrial application**

DOI:10.38152/bjtv3n4-006

Recebimento dos originais:03/11/2020 Aceitação para publicação:28/12/2020

Jessica Costa da Silva

Mestre em Ciências Biológicas Universidade Federal Rural de Pernambuco  
Endereço: Rua Dom Manoel de Medeiros s/n, Bairro: Dois Irmãos – Recife, PE,  
CEP: 52.171-900E-mail: jess.cost15@gmail.com

**Julyanne Victória dos Santos Ferreira** Graduanda em Ciências Biológicas/Licenciatura  
Universidade Federal Rural de Pernambuco

Endereço: Rua Dom Manoel de Medeiros s/n, Bairro: Dois Irmãos – Recife, PE,  
CEP: 52.171-900E-mail: juh.victoria@gmail.com

Nilson Fernando Barbosa

Graduando em Engenharia de Pesca  
Endereço: Rua Dom Manoel de Medeiros s/n, Bairro: Dois Irmãos – Recife, PE,  
CEP: 52.171-900E-mail: nilsons.fernando@gmail.com

**Beatriz de Aquino Marques Costa** Bacharel em Ciências Biológicas Universidade Federal  
Rural de Pernambuco

Endereço: Rua Dom Manoel de Medeiros s/n, Bairro: Dois Irmãos – Recife, PE,  
CEP: 52.171-900E-mail: deaquinobeatriz@gmail.com

Quesia Jemima da Silva

Mestre em Ciências e Tecnologia de Alimentos Universidade Federal Rural de Pernambuco  
Endereço: Rua Dom Manoel de Medeiros s/n, Bairro: Dois Irmãos – Recife, PE,  
CEP: 52.171-900 E-mail: quesiajemima0@gmail.com

**Sabrina Roberta Santana da Silva** Doutora em Biociência Animal Universidade Federal  
Rural de Pernambuco

Endereço: Rua Dom Manoel de Medeiros s/n, Bairro: Dois Irmãos – Recife, PE,  
CEP: 52.171-900E-mail: sabrina\_santanas@yahoo.com.br

Vagne de Melo Oliveira

Doutor em Ciências Biológicas Universidade Federal Rural de Pernambuco  
Endereço: Rua Dom Manoel de Medeiros s/n, Bairro: Dois Irmãos – Recife, PE,  
CEP: 52.171-  
900E-mail: vagne\_melo@hotmail.com

Ana Lúcia Figueiredo Porto

Doutora em Engenharia Química Universidade Federal Rural de Pernambuco

Endereço: Rua Dom Manoel de Medeiros s/n, Bairro: Dois Irmãos – Recife, PE, CEP: 52.171-900E-mail: analuporto@yahoo.com.br

## RESUMO

O aumento da produção e consumo de peixes têm gerado uma grande quantidade de resíduos sólidos: ossos, pele, escamas e vísceras digestivas (intestino, fígado, estômago). Com o intuito de aproveitar esses subprodutos, são extraídas diversas biomoléculas, entre elas, a collagenase, enzima capaz de clivar o colágeno. O objetivo deste trabalho foi selecionar e extrair enzimas collagenolíticas a partir de resíduos de peixes como potencial para aplicação biotecnológica. O material biológico das espécies em estudo passou pelos processos de separação, maceração e homogeneização. O de robalo-flecha (*Centropomus undecimalis*) ( $102,41 \pm 0,00$  U/mg) foi a espécie que apresentou maior atividade collagenolítica dentre as demais espécies: anchova (*Pomatomus saltatrix*) ( $82,24 \pm 0,00$  U/mg), xixarro amarelo (*Caranx bartholomaei*) ( $26,66 \pm 0,00$  U/mL), pampo (*Trachinotus carolinus*) ( $89,00 \pm 0,07$  U/mg), tambaqui (*Colossoma macropomum*) ( $78,23 \pm 0,00$  U/mg) e tilápia-do-Nilo *Oreochromis niloticus* ( $81,96 \pm 0,01$  U/mg). A partir desses resultados observou-se que o robalo-flecha (*C. undecimalis*) apresenta um possível potencial para aplicação biotecnológica, aumento do lucro das indústrias de pescados, além de reduzir o descarte inadequado ao meio ambiente.

**Palavras-chave:** biotecnologia, enzima, peixes, subprodutos.

**ABSTRACT**  
The increase in fish production and consumption has generated a large amount of waste: bones, skin, scales and digestive viscera (intestine, liver, stomach). In order to explore these by-products, several biomolecules are extracted, including collagenase, an enzyme capable of hydrolyzing collagen. The aim of this study was to recover collagenolytic enzymes obtained from intestinal fish residues for industrial application. The biological material of the species under study went through separation, maceration and homogenization processes. The species of seabass (*Centropomus undecimalis*) ( $102.41 \pm 0.00$  U/mg) was the species that showed greater collagenolytic activity among the other species: anchovy (*Pomatomus saltatrix*) ( $82.24 \pm 0.00$  U/mg), yellow xix (*Caranx bartholomaei*) ( $26.66 \pm 0.00$  U/mL), pampo (*Trachinotus carolinus*) ( $89.00 \pm 0.07$  U/mg), tambaqui (*Colossoma macropomum*) ( $78.23 \pm 0.00$  U/mg) and Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) ( $81.96 \pm 0.01$  U/mg). From these results it was observed that sea bass (*C. undecimalis*) has a potential for biotechnological application, increased profit from the fish industries, in addition to reducing inappropriate disposal to the environment.

**Keywords:** biotechnology, enzyme, fish, by-products.

## 1 INTRODUÇÃO

A produção mundial de pescados para consumo humano em 2018 de acordo com a Organização das Nações Unidas para Agricultura e Alimentação (FAO) foi de 156 milhões de toneladas, esse volume dá-se a produção de aquicultura 82,1 (MT) correspondente a (52%), e da pesca 74,1 t equivalente a (48%). Esses dados relatam o quanto o consumo de peixes tem sido cada vez maior pela população mundial, aumentando assim, a quantidade de resíduos sólidos gerados (FAO, 2020).



A indústria pesqueira vem crescendo muito ao enfrentar o grande desafio de aproveitamento dos subprodutos do pescado como alternativa de aumentar o lucro e evitar o desperdício no processamento do pescado (PINTO *et al.*, 2017), sendo assim, ossos, pele, escamas, cabeças e vísceras digestivas (estômago, fígado e intestino) (SILVA *et al.*, 2018) têm sido aproveitados para a extração de biomoléculas, entre elas, as enzimas colagenolíticas (OLIVEIRA *et al.*, 2019). Essas enzimas apresentam várias aplicações como: na indústria têxtil, produção de couro, detergente, biomédica (OLIVEIRA *et al.*, 2017a). A partir dessas aplicações, vê-se que alguns peixes já apresentam potencial, exemplo, tilápia-do-Nilo, a qual se utiliza a pele para tratamento biomédico (LIMA *et al.*, 2017). Como forma de aproveitar os resíduos e evitar o desperdício, este trabalho objetivou recuperar enzimas colagenolíticas obtidas a partir de resíduos intestinais de espécies de peixes visando investigar seu potencial biotecnológico.

## 2 MATERIAL E MÉTODOS

### 2.1 PROCEDIMENTOS METODOLÓGICOS

O trabalho foi realizado no Laboratório de Tecnologia de Bioativos, LABTECBIO, Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal, Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE).

### 2.2 OBTENÇÃO DO MATERIAL BIOLÓGICO

As vísceras intestinais empregadas foram provenientes: robalo-flecha (*C. undecimalis*), anchova (*Pomatomus saltatrix*) sendo adquirida junto a colônia de pescadores do Pina, em Recife-PE, xixarro amarelo (*Caranx bartholomaei*) e pampo (*Trachinotus carolinus*) pela colônia de pescadores em Jaguaripe, Itamaracá-PE, tambaqui (*Colossoma macropomum*) e tilápia-do-Nilo (*Oreochromis niloticus*) pela Estação de Aquicultura da Universidade Federal Rural de Pernambuco. Após o processamento, os resíduos foram selecionados e tratados separadamente, a saber: intestino, fígado e resquícios de músculo; para posterior recuperação de proteases colagenolíticas.

### 2.3 EXTRAÇÃO ENZIMÁTICA

A extração enzimática a partir dos resíduos sólidos de robalo (*C. undecimalis*), anchova (*P. saltatrix*), xixarro amarelo (*C. bartholomaei*) tambaqui (*C. macropomum*) e tilápia-do-Nilo (*O. niloticus*) e pampo (*T. carolinus*) foi realizada de acordo com a metodologia descrita por Oliveira *et al.* (2017b). A razão de vísceras para tampão de extração (0,05M de Tris-HCl, pH 7,5, contendo 5 mM de CaCl<sub>2</sub>) foi de 1:5 (p/v). Todas as vísceras recolhidas foram homogeneizadas separadamente durante 5 minutos em um homogeneizador

## 2.4 DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE COLAGENOLÍTICA

A determinação da atividade colagenolítica foi realizada segundo metodologia descrito por Oliveira *et al.* (2017b), utilizando Azo dye-impregnated collagen - Azocoll (Sigma) como substrato. Uma mistura de reação, que contém 5 mg de azocoll, 500 µl de 50 mM Tris-HCl (pH 7,5) que continha CaCl<sub>2</sub> 5 mM e 500 µl de extrato enzimático, foram incubados a 55°C durante 30 minutos, sob agitação constante e em quadruplicata. Posteriormente, foram adicionados 200 µl de ácido tricloroacético (TCA) e incubadas para parar a reação. Após 5 minutos, as amostras foram centrifugadas (Centrífuga SorvallSuperspeed RC-6, Carolina do Norte, EUA) a 10.000 x g durante 5 minutos, a 4°C. A leitura da amostra foi realizada com espectrofotômetro em um comprimento de onda de 595 nm. Uma unidade de enzima foi definida como a quantidade de enzima necessária para aumentar a absorção de 0,01 a 595 nm.

## 3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Após os resíduos intestinais serem processados (macerados, homogeneizados centrifugados) para a produção do extrato bruto, observa-se que todas as espécies apresentam grande teor de proteínas e atividades colagenolíticas (tabela 1), porém a espécie robalo-flecha (*C. undecimalis*) apresentou maior teor de proteínas e atividade colagenolítica comparada as demais espécies, que embora apresentem dados inferiores, todas as espécies deste estudo se mostram superior ao estudo realizado por Daboor *et al.* (2012), cuja atividade colagenolítica foi  $11.63 \pm 2.14$  U/mg, respectivamente.

Estudo realizado por Oliveira *et al.* (2019) com a víscera (intestino) da espécie tucunaré (*Cichlaocellaris*) mostra o valor do teor de proteínas e atividade colagenolítica inferior ao deste estudo, embora o extrato enzimático tenha passado por 4 etapas, apenas a etapa 2 se mostrou superior. No entanto a atividade colagenolítica do xixarro amarelo (*C. bartholomaei*) foi inferior comparado a este mesmo estudo.

Espécie	Nome popular	Dosagem de proteínas (U/mg)	Atividade Colagenolítica (U/mg)
<i>Centropomus undecimalis</i>	Robalo-flecha	$1666,02 \pm 0,00$	$102,41 \pm 0,00$
<i>Pomatomus saltatrix</i>	Anchova	$1659,61 \pm 0,00$	$82,24 \pm 0,00$
<i>Caranx bartholomaei</i>	Xixarro amarelo	$413,44 \pm 0,05$	$26,66 \pm 0,00$
<i>Trachinotus carolinus</i>	Pampo	$484,27 \pm 0,01$	$89,00 \pm 0,07$
<i>Colossoma macropomum</i>	Tambaqui	$514,83 \pm 0,04$	$89,00 \pm 0,07$
<i>Oreochromis niloticus</i>	Tilápia-do-Nilo	$1223 \pm 0,28$	$81,96 \pm 0,01$

Tabela 1. Resultados da atividade colagenolítica e proteínas das espécies.

Fonte: própria

#### 4 CONCLUSÃO

A partir deste estudo conclui-se que as vísceras intestinais indicam um grande potencial aplicações biotecnológicas, principalmente da do robalo-flecha (*C. undecimalis*), a qual apresentou melhor atividade collagenolítica, dentre as demais espécies. Essas enzimas após a submissão de vários processos de purificação podem ser aplicadas na indústria em diversas áreas, contribuindo para o aumento do lucro não só das grandes indústrias pesqueiras como do próprio aquicultor, além de reduzir os descartes inadequados desses resíduos para o meio ambiente.

#### AGRADECIMENTOS

Agradeço a Coordenação de Apoio a Pesquisa de Nível Superior (CAPES), pela concessão de bolsa de mestrado para a realização deste projeto.

#### REFERÊNCIAS

- DABOOR, S.M., BUDGE, S.M., GHALY, A.E., BROOKS, M.S., DAVE, D. Isolation and activation of collagenase from fish processing waste. **Advances in Bioscience and Biotechnology**, v.3, p.191- 203, 2012.
- FAO. 2020. **The State of World Fisheries and Aquaculture 2020**. Sustainability in action. Rome. <https://doi.org/10.4060/ca9229en>
- LIMA-JUNIOR, E. M.; PICOLO, N.S.; MIRANDA, M. J.B.; RIBEIRO, W.L.C.; ALVES, A.P.N.N.; FERREIRA, G.E.; PARENTE, E.A.; MORAES-FILHO, M.O.; Uso da pele de tilápia (*Oreochromis niloticus*), como curativo biológico oclusivo, no tratamento de queimaduras. **Revista Brasileira de Queimaduras**, n.16, v. 1, p.10-17, 2017
- OLIVEIRA, V.M.; CARNEIRO CUNHA, M.N.; NASCIMENTO, T.P.; ASSIS, C.R.D.; BEZERRA, R.S.; PORTO, A.L.F. Collagen: general characteristics and production of bioactive peptides - a review with emphasis on byproducts of fish. **ActaFish**, v.5, n.2, p.70-82, 2017a.
- OLIVEIRA, V.M., CARNEIRO CUNHA, M.N., ASSIS, C.R.D., NASCIMENTO, T.P., HERCULANO, P. N., CAVALCANTI, M.T.H., PORTO, A. L. Collagenases de pescado e suas aplicações industriais. **Pubvet**, v.11, n.3, p.243-255, 2017b.
- OLIVEIRA, V.M.; SILVA, J.C.; SILVA, Q.G.; PORTO, A.L.F. Purificação parcial de biomoléculas extraídas dos resíduos sólidos do pescado beneficiado em Petrolândia-PE. In: AGUIAR, A.C.; SILVA, K.A.; GIOVANETTI-DEIR, S. (Org.). **Resíduos sólidos: impactos ambientais e inovações tecnológicas**. 1ed. Recife: EDUFPRPE, 2019, p.127-139.



PINTO, B.V.V.; BEZERRA, A.E.; AMORIM, E.; VALADÃO, R.C.; OLIVEIRA, G.M. O resíduo de pescado e o uso sustentável na elaboração de co-produtos. **Revista Mundi Meio Ambiente e Agrárias**, v.2, n.2, p. 1-26, 2017.

SILVA, G.C.O.; SILVA, S.S.; CARVALHO, J.W.P.; GUEDES, F.S.; LOSS, R.A. Obtenção e caracterização físico-química e microbiológica da gelatina de resíduos de matrinx (*Bryconamazonicus*) e tambaqui (*Colossoma macroponum*). **Acta of Fisheries and Aquatic Resources**, v.6, n.1, p.74-84, 2018.

SMITH, P.K.; KROHN, R.I.; HERMANSON, G.T.; MALLIA, A.K.; GARTNER, F.H.; PROVENZANO, M.Z.; FUJIMOTO, E.K.; GOEKE, N.M.; OLSON, B.J.; KLENK, D.C. Measurement of protein using bicinchoninic acid. **Analytical Biochemistry**, v.150, n.1, p.76-85, 1985.



**MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO E DO DESPORTO  
UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO**

**DECLARAÇÃO**

Declaro, para os devidos fins, que o artigo intitulado “MATÉRIA-PRIMA DA PESCA E AQUICULTURA COM POTENCIAL PARA TRATAMENTO DO COVID-19; A SOLUÇÃO ESTÁ NOS RESÍDUOS DO PESCADO?” , de autoria de OLIVEIRA, Vagne Melo, COSTA, Beatriz de Aquino Marques, SILVA, Jessica Costa da e COSTA, Beatriz de Aquino Marques, foi aprovado para compor os Anais do VIII Congresso Brasileiro de Resíduos Sólidos, que tratará do Tema: Resíduos sólidos e covid-19: desafios e impactos na gestão. O Congresso ocorrerá nos dias 9 a 12 de agosto do corrente ano, de forma virtual, com atividades síncronas e assíncronas, tendo registro no site [www.epersol2021.online](http://www.epersol2021.online).

Recife, 06 de julho de 2021

A assinatura de Profa. Soraya El-Deir é uma escrita manuscrita em tinta preta, com uma letra 'S' inicial grande e decorativa.

Presidência da Comissão Técnica-Científica VII Congresso Brasileiro de Resíduos Sólidos



**MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO E DO DESPORTO  
UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO**

**DECLARAÇÃO**

Declaro, para os devidos fins, que o artigo intitulado “SUBPRODUTOS DA AVICULTURA E PISCICULTURA; NOVAS ESTRATÉGIAS BIOATIVAS PARA O COMBATE A COVID-19”, de autoria de OLIVEIRA, Vagne Melo, SILVA, Jessica Costa da, COSTA, Beatriz de Aquino Marques e PORTO, Ana Lúcia Figueiredo, foi aprovado para compor os Anais do VIII Congresso Brasileiro de Resíduos Sólidos, que tratará do Tema: Resíduos sólidos e covid- 19: desafios e impactos na gestão. O Congresso ocorrerá nos dias 9 a 12 de agosto do corrente ano, de forma virtual, com atividades síncronas e assíncronas, tendo registro no site [www.epersol2021.online](http://www.epersol2021.online).

Recife, 06 de julho de 2021

A assinatura é manuscrita, em uma caligrafia cursiva, e representa o nome Soraya El-Deir.

Profa. Soraya El-Deir

Presidência da Comitê Técnico-Científica VII Congresso Brasileiro de Resíduos Sólidos