



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

JESSICA COSTA DA SILVA

**SELEÇÃO, PRECIPITAÇÃO E PARTICIONAMENTO DE PROTEASES COM
ATIVIDADES COLAGENOLÍTICAS EXTRAÍDAS DOS RESÍDUOS DO
PESCADO**

Recife

2019

JESSICA COSTA DA SILVA

**SELEÇÃO, PRECIPITAÇÃO E PARTICIONAMENTO DE PROTEASES COM
ATIVIDADES COLAGENOLÍTICAS EXTRAÍDAS DOS RESÍDUOS DO PESCADO**

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

Área de concentração: Biotecnologia

Orientadora: Prof. Dr^a. Ana Lúcia Figueiredo Porto

Coorientador: Prof. Dr. Vagne de Melo Oliveira

Recife

2019

Catálogo na Fonte:
Bibliotecário Bruno Márcio Gouveia, CRB-4/1788

Silva, Jessica Costa da
Seleção, precipitação e particionamento de proteases com atividades
colagenolíticas extraídas dos resíduos do pescado / Jessica Costa da Silva. – 2020.

62 f. : il.

Orientadora: Ana Lúcia Figueiredo Porto.

Coorientador: Vagne de Melo Oliveira.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco. Centro
de Biociências. Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas,
Recife, 2020.

Inclui referências e anexos.

1. Enzimas. 2. Indústria pesqueira. 3. Pesca – Subproduto. I. Porto, Ana

672.7

CDD (22.ed.)

UFPE/CB-2020-047

JESSICA COSTA DA SILVA

**SELEÇÃO, PRECIPITAÇÃO E PARTICIONAMENTO DE PROTEASES COM
ATIVIDADES COLAGENOLÍTICAS EXTRAÍDAS DOS RESÍDUOS DO PESCADO**

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

Área de concentração: Biotecnologia

Aprovada: 25/02/2019

COMISSÃO EXAMINADORA

Prof.^a Dr.^a Ana Lúcia Figueiredo Porto – (Orientadora)
Universidade Federal Rural de Pernambuco

Prof.^a Dr.^a Márcia Vanusa da Silva – (Examinadora interna)
Universidade Federal de Pernambuco

Dr.^a Márcia Nieves Carneiro da Cunha - (Examinadora externa)
Universidade Federal Rural de Pernambuco

Primeiramente a Deus por ter me dado forças para concluir mais uma etapa importante da minha vida, aos meus pais e irmão por sempre me apoiarem e acreditarem em mim.

Dedico

“Melhor é o final das coisas que o princípio delas. (BÍBLIA, Eclesiastes 7:8a)”

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus que através da sua graça infinita me permite estar concluindo mais uma etapa importante na minha vida.

Aos meus queridos pais Genival e Josilene por todo apoio, carinho e incentivo durante esta caminhada. Agradeço em especial a minha mãe que sempre se preocupou para que eu tivesse uma boa formação. Mainha, muito obrigada por tudo!

Ao meu querido e amado irmão Giovanne que sempre esteve me apoiando nos momentos de dificuldade e sempre me ajudando no que estivesse ao seu alcance, muito obrigada!

A Késsia pelo apoio, carinho e paciência. Que mesmo tendo várias obrigações a fazer, estava me apoiando no que fosse preciso, muito obrigada!

A minha orientadora Prof^a. Dr^a. Ana Porto por ter me recebido de braços abertos no Labtecbio. Agradeço a Deus por toda sua paciência, carinho, confiança e ensinamentos durante este período.

Ao meu co-orientador Prof. Dr. Vagne Melo pelos ensinamentos, compreensão, paciência e por sempre estar disponível em esclarecer minhas dúvidas, muito obrigada por tudo!

Aos colegas do Labtecbio/UFRPE pelos ensinamentos Juanize, Márcia, Sabrina, Quesia, Felipe, Túlio, Romero, Gabrielle, Elaine, Lígia, Michelly e Ieda por todo apoio e pelos momentos de descontração durante a realização deste projeto.

Ao Labenz/UFPE, o prof^o. Dr. Ranilson por abrir as portas do Labenz/UFPE para utilização dos equipamentos e no que fosse preciso. Aos pós-doutorandos Janilson e Thiago por ensinar a manusear os equipamentos, pela paciência e sugestões. Os colegas de laboratório, muito obrigada!

Ao laboratório de produtos naturais.

A coordenação, secretária e estagiários da Pós-graduação em Ciências Biológicas.

Ao funcionário Sr. Romildo pela companhia durante o horário de almoço.

A Rhayane por escutar meus desabafos e pelas orações. A Tatiane por me acompanhar nas coletas iniciais. Muito obrigada pela paciência!

A CAPES, CNPq e FACEPE pelo apoio financeiro neste projeto.

RESUMO

A recuperação de biomoléculas a partir dos subprodutos do pescado tem sido considerada uma prática cada vez mais incentivada, muito devido à fonte abundante de proteases de importância biotecnológica. Dentre os subprodutos, as vísceras internas, principalmente as intestinais, são altamente desejadas. Deste modo, este trabalho objetivou recuperar atividades collagenolíticas de subprodutos do pescado usando técnicas de precipitação e de particionamento. Para tanto, foram pré-selecionadas: robalo-flecha *Centropomus undecimalis* ($102,41 \pm 0,00$ U/mg), 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). Os resíduos com maior atividade collagenolítica foram selecionados (*C. undecimalis*) e utilizados para pré-purificação. O extrato enzimático de *C. undecimalis* foi selecionado, apresentando atividade proteolítica de 173,7 U/ml, sendo em seguida purificado parcialmente através de técnicas de precipitação em solventes em diferentes frações, obtendo-se melhores condições (atividade collagenolítica específica, rendimento (y) e fator de purificação (FP)) nas proporções de acetona 90% (246,92 U/mg; y: 24,14%; FP: 2,41), de etanol 60% (116,96 U/mg; y: 8,64%; FP: 1,14) e de sulfato de amônia (NH₄)₂SO₄ fração 60-90% (54,54 U/mg; y: 11,18%; FP: 0,53). Em seguida, o material enzimático foi particionado empregando-se um sistema bifásico, planejamento fatorial de 2⁴, na qual foram analisados as variáveis: concentração de massa molar do polietileno glicol (M_{MPEG}/g/mol) de (400, 3350 e 8000), concentrações de citrato (C_{CTI}/w/w), concentração do polietileno glicol (C_{PEG}/w/w) e pH (6, 7 e 8). O ensaio 2, formado pela M_{MPEG} 8000, C_{PEG} 20, C_{CIT} 15 e pH 6 apresentou maior fator de purificação (3,91), coeficiente de partição (0,63) e rendimento (326,52%). Assim, observou-se que as técnicas de precipitação utilizando solventes orgânicos e de particionamento usando sistema bifásico (PEG/citrato) são altamente recomendadas para a recuperação e purificação parcial de proteases collagenolíticas extraídas de resíduos do pescado processado com potencial uso biotecnológico.

Palavras-chave: Enzimas. Peixes. Purificação. Subprodutos.

ABSTRACT

The recovery of biomolecules from fish by-products has been considered an increasingly encouraged practice, largely due to the abundant source of proteases of biotechnological importance. Among the byproducts, the internal viscera, especially the intestinal ones, are highly desired. Thus, this work aimed to recover collagenolytic activities of fish by-products using precipitation and partitioning techniques. Thus, this work aimed to recover collagenolytic activities of fish by-products using precipitation and partitioning techniques. In order to do so, the following species were pre-selected: common snook *Centropomus undecimalis* (102.41 ± 0.00 U/mg), anchovy *Pomatomus saltatrix* (82.24 ± 0.00 U/mg) yellow jack *Caranx bartholomaei* (26.66 ± 0.00 U/mg), pompano *Trachinotus carolinus* (89.00 ± 0.07 U/mg), tambaqui *Colossoma macropomum* (78.23 ± 0.00 U/mg) and Nile tilapia *Oreochromis niloticus* (81.96 ± 0.01 U/mg). The enzymatic extract of *C. undecimalis* was selected, presenting proteolytic activity of 173.7 U/ml, and then partially purified by precipitation techniques in solvents in different fractions, obtaining better conditions (specific collagenolytic activity, yield (y) and purification factor (PF)) in the proportions of acetone 90% (246.92 U/mg; y: 24.14%; FP: 2.41), of ethanol 60% (116.96 U/mg; y: 8.64%; FP: 1.14) and ammonium sulfate $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ fraction 60-90% (54.54 U/mg; y: 11.18%; FP: 0.53). Then, the enzymatic material was partitioned using a two-phase system, factorial design of 2^4 , in which the following variables were analyzed: molar mass concentration of polyethylene glycol (M_{MPEG} /g/mol) of (400, 3350 and 8000), concentrations of citrate (C_{CIT} /w/w), concentration of polyethylene glycol (C_{PEG} /w/w) and pH (6, 7 and 8). Test 2, formed by M_{MPEG} 8000, C_{PEG} 20, C_{CIT} 15 and pH 6 presented higher purification factor (3.8), partition coefficient (21.46) and yield (195.2%). Thus, it has been observed that precipitation techniques using organic solvents and partitioning using a two-phase system (PEG/citrate) are highly recommended for the partial recovery and purification of collagenolytic proteases extracted from fish waste with potential biotechnological use.

Keywords: Enzymes. Fish. Purification. By-products.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Resíduos sólidos descartados da espécie robalo	17
Figura 2 – Sistema de duas fases aquosas	20

ARTIGO

Figura 1 – Pareto chart of standardized effects of the factors. (1) PEGMM: polyethylene glycol molar mass; (2) CPEG %: polyethylene glycol concentration; (3) pH: pH factor; (4) CCIT%: phosphate concentration on the variable in 24-full factorial design1 by 2,3, 4; 3 by 4; 2 by 3, 4 are the interaction effects between the factors.....	35
Figura 2 – Simultaneous effect of the interaction of PEG molar mass (MMPEG), PEG concentration (CPEG) and pH under the variable fator purification factor (PF).....	36

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Subprodutos do pescado como fonte de biomoléculas proteicas.....	17
Tabela 2 – Particionamento enzimático empregando sistema de duas fases aquosas em diferentes tipos de organismos.....	21

ARTIGO

Tabela 1 – Experimental design 2^4 for collagenolytic protease partition using PEG-citrate ATP.....	33
Tabela 2 – Protein precipitation of the crede extract of <i>C. undecimalis</i>	33
Tabela 3 – Matrix of the full factorial design (2^4) with conditions and results of the collagenololytic protease partition.....	34

LISTA DE ABREVIATURAS

Azocoll	Azo dye-impregnated collagen
BAPNA	Benzoil arginina ρ -nitroanilida
C _{PEG}	Concentração de Polietileno glicol
C _{CIT}	Concentração de Citrato de Sódio
PEG	Polietileno glicol
K	Coeficiente de partição
SDFA	Sistema de duas fases aquosas
M _{PEG}	Massa Molar do Polietileno glicol
Y	Rendimento
RPM	Rotações por minuto
pH	Potencial hidrogeniônico
FP	Fator de purificação
Mm	Milimolar
TCA	Ácido tricloroacético
SAPNA	Succinil- alanina-fenilalanina-p-nitroanilina
BENZ	Benzamidina
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
PMSF	Fenil-metil-sulfonil fluoreto
TLCK	Tosil lisina clorometil cetona
TPCK	Tosil fenilalanil clorometil cetona

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	14
1.1	OBEJETIVOS.....	15
1.1.1	Objetivo Geral.....	165
1.1.2	Objetivos Específicos.....	165
2	REFERÊNCIAL TEÓRICO.....	16
2.1	RESÍDUOS COMO FONTE DE BIOMOLÉCULA.....	16
2.2	ENZIMAS DO PESCADO.....	17
2.3	APLICAÇÕES DA COLAGENASE.....	18
2.4	SEPARAÇÃO DE PROTEÍNAS.....	19
2.4.1	Separação de proteínas por precipitação.....	19
2.4.2	Separação por sistema bifásico (particionamento).....	20
3	RECOVERY, SEPARATION AND PARTIAL PURIFICATION OF COLLAGENOLYTIC PROTEASES FROM FISH RESIDUES: COMPARATIVE STUDY USING PARTITIONING TWO-PHASE AND PRECIPITATION TECHNIQUES.....	22
4	CONCLUSÃO.....	37
	REFERÊNCIAS.....	38
	ANEXO A - NORMAS DA REVISTA.....	41
	ANEXO B - PARTICIPAÇÃO EM APRESENTAÇÃO DE TRABALHO EM EVENTO CIENTÍFICO.....	48
	ANEXO C - PARTICIPAÇÃO EM APRESENTAÇÃO DE TRABALHO EM EVENTO CIENTÍFICO.....	49
	ANEXO D - PARTICIPAÇÃO EM APRESENTAÇÃO DE TRABALHO EM EVENTO CIENTÍFICO.....	50
	ANEXO E - PARTICIPAÇÃO EM APRESENTAÇÃO DE TRABALHO EM EVENTO CIENTÍFICO.....	51
	ANEXO F - PARTICIPAÇÃO EM APRESENTAÇÃO DE TRABALHO EM EVENTO CIENTÍFICO.....	52
	ANEXO G - PARTICIPAÇÃO EM APRESENTAÇÃO DE TRABALHO EM EVENTO CIENTÍFICO.....	53
	ANEXO H - PARTICIPAÇÃO EM APRESENTAÇÃO DE TRABALHO EM EVENTO CIENTÍFICO.....	54

ANEXO I - PARTICIPAÇÃO EM APRESENTAÇÃO DE TRABALHO EM EVENTO CIENTÍFICO.....	55
ANEXO J - PARTICIPAÇÃO EM APRESENTAÇÃO DE TRABALHO EM EVENTO CIENTÍFICO.....	56
ANEXO K - PARTICIPAÇÃO EM APRESENTAÇÃO DE TRABALHO EM EVENTO CIENTÍFICO.....	57
ANEXO L - PARTICIPAÇÃO EM APRESENTAÇÃO DE TRABALHO EM EVENTO CIENTÍFICO.....	58
ANEXO M - PARTICIPAÇÃO EM APRESENTAÇÃO DE TRABALHO EM EVENTO CIENTÍFICO.....	59
ANEXO N - MENÇÃO HONROSA	62
ANEXO O - MENÇÃO HONROSA	61
ANEXO P - PARTICIPAÇÃO EM ARTIGO/COAUTORIA.....	62

1 INTRODUÇÃO

A recuperação de proteases a partir dos descartes do beneficiamento do pescado tem sido uma prática ecologicamente benigna. Aproximadamente, para cada 1 tonelada de pescado capturado, cerca de 50 a 60% são negligenciados por não possuírem valor comercial e isso se reflete na questão ambiental, uma vez que a carência de políticas públicas para tratamento e destino adequado desses resíduos acabam corroborando para o aumento da poluição aquático, muitas vezes tornando-se deletérios aos sistemas. Dentre esses descartes, estão: cabeça, cauda, barbatanas, escamas, pele e vísceras digestivas (OLIVEIRA et al., 2017a).

Segundo a Organização das Nações Unidas para Alimentação e Agricultura (FAO), a produção brasileira de pescado em 2013 foi de 1.241.807 t, sendo que, destas, 765.287 t foram de origem da pesca (61,6%) e 476.512 t de origem da aquicultura (38,4%). Desse montante, boa parte do percentual é de espécies de peixes neotropicais (FAO, 2016).

Recuperar proteases de fontes residuais tornou-se uma meta para muitos planos de gestão ambiental, sobretudo ao atrelado ao desenvolvimento do estado de Pernambuco. Vísceras digestivas de organismos aquáticos podem subsidiar de forma alternativa mercados de matéria-prima no fornecimento de moléculas biológicas por ser uma fonte barata e de fácil acesso, agregando segmentos terapêuticos, clínicos, biomédicos, alimentício e até de ração animal (OLIVEIRA et al., 2017a). Essas vísceras são abundantes em proteases, principalmente as colagenolíticas, enzimas empregadas na hidrólise do colágeno e no tratamento de feridas, queimaduras e processos de cicatrização em geral (ALVES et al., 2015).

Ciente desta problemática e da viabilidade de utilização de resíduos como matéria-prima viável, este trabalho objetivou recuperar proteases com propriedades colagenolíticas e purificá-las parcialmente usando técnicas de precipitação e o particionamento pelo sistema bifásico PEG/citrato de forma a agregar valor ao produto pesqueiro, contribuir para aumento da renda dos produtores envolvidos, e contribuiu para planos de gestão ambiental e com o desenvolvimento econômico ao propor uma nova espécie como fonte de proteases para o mercado de enzimas.

1.1 OBJETIVOS

1.1.1 Objetivo Geral

Selecionar, precipitar e particionar proteases com atividades collagenolíticas extraídas dos resíduos do pescado.

1.1.2 Objetivos Específicos

- Selecionar e recuperar resíduos (intestinais) de espécies de peixes neotropicais provenientes do processamento;
- Extrair enzimas com propriedades collagenolíticas a partir de vísceras intestinais das espécies pré-selecionadas;
- Pré-purificar a protease collagenolítica a partir de diferentes técnicas de precipitação;
- Avaliar a influência das variáveis sob a partição da enzima collagenolítica por Sistemas de Duas Fases Aquosas (SDFA);
- Caracterizar o perfil de sensibilidade da enzima particionada quanto à exposição a inibidores naturais e sintéticos.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 RESÍDUOS COMO FONTE DE BIOMOLÉCULAS

As biomoléculas podem ser encontradas em diversos organismos aquáticos, entre elas estão as proteínas e enzimas com propriedades colagenolíticas. Essas proteases apresentam importância tanto no ponto de vista fisiológico, como também atuam na regeneração de tecidos, além de possuir uma ampla aplicação biotecnológica (OLIVEIRA et al., 2017a). Essas enzimas também têm a capacidade de hidrolisar ligações peptídicas formadas por peptídeos de colágeno (LIMA et al., 2015; OLIVEIRA et al., 2017c).

As proteases podem ser utilizadas em diferentes etapas para obtenção de biomoléculas ativas, tornando-se um ótimo exemplo como potencial de enzimas no aproveitamento de resíduos de pescado (OLIVEIRA et al., 2017c) na qual podem ser empregadas em diversos âmbitos industriais, estando atrelado ao avanço da tecnologia, permitindo que essas biomoléculas passem por diferentes processos de caracterização e purificação até definir sua função e onde podem ser empregadas. As técnicas de purificação têm sido de extrema importância para indústrias, tendo em vista que elas preferem procedimentos rápidos e de baixo-custo comercial.

O crescimento da aquicultura e a demanda da produção de pescado têm implicado na grande geração de resíduos, subprodutos provenientes do processamento da pesca (figura 1). Devido à aquicultura ser bastante explorada pelo setor pesqueiro, a mesma tem se tornado uma das alternativas mais viáveis para a produção de alimentos ricos em aminoácidos, ômega 3 e proteínas para alimentação humana (AMÉRICO et al., 2013; OLIVEIRA et al., 2017d).

A partir dos resíduos de peixes: barbatanas, bexiga natatória, dentina, escamas, ossos, pele e vísceras intestinais que podem ser aproveitados para aplicações indústrias, gerando uma fonte de renda maior para o pequeno produtor aquícola e para grandes empreendimentos pesqueiros. A partir desses resíduos que são descartados de forma inadequada, podem ser encontradas várias biomoléculas de interesse industrial, uma delas é a colagenase, muito utilizado no tratamento do envelhecimento precoce, estética, cosméticos, entre outros (OLIVEIRA et al., 2019).

Figura 1. Resíduos sólidos descartados da espécie Robalo

Fonte: Acervo pessoal

2.2 ENZIMAS DO PESCADO

O pescado é uma fonte rica em enzimas, muitas das quais com as mais variadas aplicações, tais como tripsina, quimotripsina, collagenase, elastina, pepsina, entre outras (tabela 1). Enzimas colagenolíticas são aquelas capazes de clivar a tripla hélice do colágeno e isso as torna altamente desejadas pelo mercado global de enzimas (OLIVEIRA et al., 2017b). Muitas das enzimas que auxiliam nessa função, acabam sendo incluídas neste grupo, a exemplo da tripsina e quimotripsina (OLIVEIRA et al., 2017a).

Tabela 1: Subprodutos do pescado como fonte de biomoléculas proteicas

Espécie	Resíduos	Enzima	Atividade específica	Referência
<i>Symphysodon aequifasciatus</i>	Intestino	Tripsina	0,79 U.mg ⁻¹	Chong et al. (2002)
<i>Symphysodon aequifasciatus</i>	Intestino	Quimotripsina	0,61 U.mg ⁻¹	Chong et al. (2002)
<i>Oreochromis niloticus</i>	Intestino	Tripsina	3,39 U.mg ⁻¹	Bezerra et al. (2005)
<i>Carassius auratus</i>	Hepatopâncreas	Quimotripsina	0,62 U.mg ⁻¹	Yang et al. (2009)
<i>Diapterus rhombeus</i>	Vísceras digestivas	Tripsina	1,81 U.mg ⁻¹	Silva et al. (2011)

<i>Arapaima gigas</i>	Cecos pilóricos	Tripsina	0,37 U.mg ⁻¹	Freitas-Junior et al. (2013)
<i>Caranx hippos</i>	Cecos pilóricos	Tripsina	0,9 U.mg ⁻¹	Costa et al. (2013)
<i>Cichlasoma urophthalmus</i>	Vísceras internas	Tripsina	0,52 U.mg ⁻¹	Cuenca-Soria et al. (2014)
<i>Cichlasoma urophthalmus</i>	Vísceras internas	Quimotripsin a	0,8 U.mg ⁻¹	Cuenca-Soria et al. (2014)
<i>Atractosteus tropicus</i>	Trato digestivo	Tripsina	0,02 U.mg ⁻¹	Guerrero-Zárate et al. (2014)
<i>Atractosteus tropicus</i>	Trato digestivo	Quimotripsin a	4,0 U.mg ⁻¹	Guerrero-Zárate et al. (2014)
<i>Cirrhinus mrigala</i>	Trato digestivo	Tripsina	0,086 U.mg ⁻¹	Khangembam e Chakrabarti (2015)
<i>Rachycentron canadum</i>	Cecos pilóricos	Tripsina	0,55 U/mg ⁻¹	França et al. (2016)
<i>Liza aurata</i>	Vísceras digestivas	Tripsina	0,16 U/mg ⁻¹	Bkhairia et al. (2016)
<i>Seriola dumerili</i>	Intestino	Tripsina	1,46 U.mg ⁻¹	Oliveira et al. (2017b)
<i>Seriola dumerili</i>	Intestino	Quimotripsin a	0,71 U.mg ⁻¹	Oliveira et al. (2017b)
<i>Thunnus alalunga</i>	Fígado	Tripsina	0,65 U.mg ⁻¹	Klomklao e Benjakul (2018)

Fonte: Oliveira et al. (2018)

2.3 APLICAÇÕES DA COLAGENASE

O uso da collagenase na indústria biomédica e farmacêutica tem se tornado uma grande ferramenta para aplicações clínicas e terapêuticas, sobretudo para a medicina humana, podendo ser aplicada em feridas necrosadas, no processo de cicatrização pós-cirurgia, queimaduras, regeneração dos tecidos da pele, implantes, perdas ósseas, lesões de mamilos ocasionados pelo processo de aleitamento materno, glaucoma, reparação de cartilagem, mioma uterino, oclusões totais, celulite, quelóide, pré-tratamento para melhorar a terapia gênica do câncer mediada por adenovírus (ROSSO et al., 2012; LIMA, et al., 2013; TALLIS et al., 2013; CHANDIKA et al., 2015; ALIPOUR et al., 2016; WANDERLEY et al., 2016; CHAUHAN et al., 2017, OLIVEIRA et al., 2017c).

A collagenase tem uma aplicação importante na doença de Dupuytren, essa doença caracteriza-se pela ocorrência de uma hipertrofia da fáscia palmar, decorrente do surgimento de uma fibroplasia proliferativa do tecido subcutâneo, impossibilitando a movimentação das

mãos do indivíduo para realizar as suas atividades cotidianas, além da perda da sensibilidade (GUILHEN et al., 2014; GEROSA et al., 2018; MANSUR et al., 2018).

Dos vários tipos de collagenases empregadas, a proveniente da bactéria *Clostridium Histolyticum* é a que tem mais sido utilizada (DUARTE, et al., 2014 e OLIVEIRA, et al., 2017c) principalmente na aplicação da doença de Dupuytren (SANJUAN-CERVERÓ et al., 2017), assim como no tratamento de queimaduras e úlceras dérmicas. Atualmente, com a perspectiva de diminuir os custos dos curativos oclusivos sintéticos ou bio sintéticos, frequência de troca de curativo convencional para o tratamento de queimaduras tem sido buscando alternativa como a utilização de materiais biológicos para o tratamento de queimaduras a partir da pele da espécie tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) (LIMA-JÚNIOR et al., 2017).

A aplicação de enzimas na indústria de couro tem desempenhado uma grande importância, sobretudo, para as proteases collagenolíticas, que têm sido utilizadas no tratamento de couros, tingimento de tecidos, apresentando um bom funcionamento como biotacalisador não tóxico possuindo um tingimento de melhor qualidade e contribuindo para o meio ambiente na redução da carga de poluição durante o processo pós-tingimento (OLIVEIRA et al., 2017). Através da utilização da collagenase durante o processo de tingimento do couro pode-se obter quase 100% de absorção do corante devido a abertura das fibras de colágeno, além disso, proporcionando melhor maciez e suavidade do tecido após o tratamento com collagenases (LIMA, 2012).

2.4 SEPARAÇÃO DE PROTEÍNAS

2.4.1 Separação de proteínas por precipitação

A precipitação de biomoléculas é uma das técnicas mais utilizadas em procedimentos laboratoriais quanto para aplicações industriais em vários processos biotecnológicos, podendo ser aplicada em proteínas de origem animal, microbiana e vegetais (JÚNIOR et al., 2015), sendo uma alternativa viável principalmente para escalas que priorizam baixo custo, como o setor pesqueiro (OLIVEIRA et al., 2019).

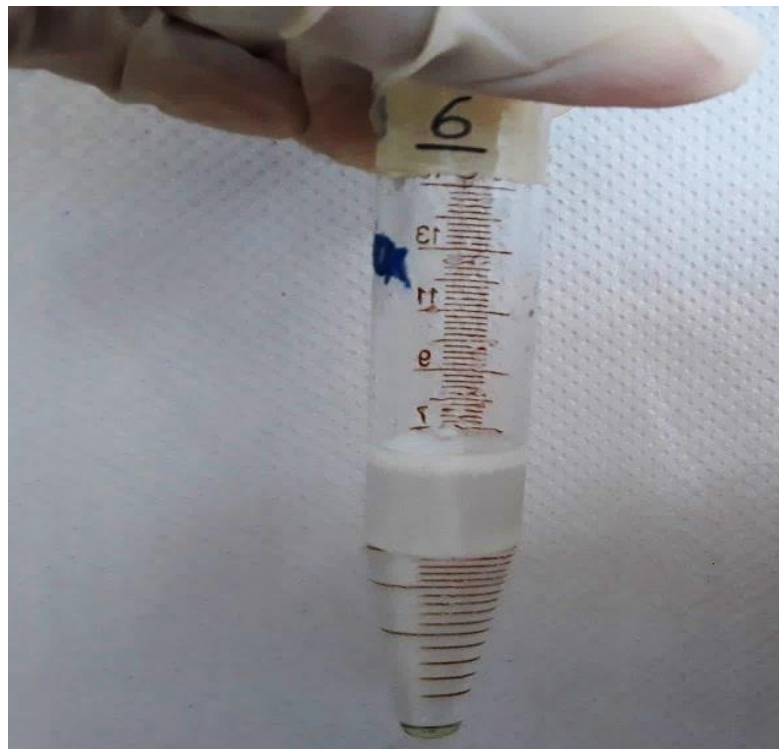
As precipitações podem ser realizadas através dos solventes orgânicos acetona e etanol, assim como pela adição de sal, um exemplo é o sulfato de amônia, que além de apresentar baixa solubilidade no processo de precipitação, permite a menor densidade das proteínas. Após a amostra ser precipitada por sulfato de amônia é necessário que biomolécula seja dialisada para a remoção do sal e separação de concentrações diferentes por uma membrana semipermeável,

fazendo com que as soluções se encontrem com concentrações iguais após a passagem de solutos de uma substância para a outra (PESSOA JÚNIOR, 2011).

2.4.2 Separação por sistema bifásico (particionamento)

O particionamento de biomoléculas através do sistema de duas fases aquosas (SDFA) (Figura 3) possui um determinado grau de pureza podendo ser aplicados em diferentes tipos de organismos provenientes de célula animal, vegetal, fungos e aplicação de enzimas (tabela 3). A técnica do SDFA apresenta uma metodologia simples, prática e de baixo custo no processo de separação de proteínas, além de garantir alta eficiência no processo de rendimento (AMID et al., 2015). Embora o processo de purificação pelo SDFA seja eficiente para determinados tipos de moléculas que não exigem um alto grau de pureza é necessário a aplicação de técnicas mais aprimoradas.

Figura 2. Sistema de duas fases aquosas



Fonte: acervo pessoal

Tabela 2. Particionamento enzimático empregando sistema de duas fases aquosas em diferentes tipos de organismos.

Autor	Organismo	Enzima	pH	K^a	Y^b%	FP^c	Tipo
Silva et al. (2018)	fungo	poligalacturonase	8	4,1	85,20	1,8	Citrato/peg
Wanderley et al. (2018)	fungo	colagenase	7	1	83	27,61	Citrato/peg - citrato/fosf
Yavari et al. (2013)	bactéria	protease	7,5	2,4	93	2,62	C/peg
Nascimento et al. (2016)	fungo	protease	3	0,5	7,89	4,5	Peg/Sulfato de sódio não tem PH
Maciel et al. (2014)	fungo	poligalacturonase	6	1,23	74,04	8,18	C/peg - C/phosfato
Silva et al. (2017)	Fungo	protease	8	1,21	55,8	3,95	C/peg - C/phosfato
Nascimento et al. (2013)	planta	lectina	5	8,32	125	13,29	C/peg - C/phosfato C/peg - C/phosfato
Lima et al. (2013)	fungo	colagenase	6	1,20	48,13	5,23	
Porto at al., (2006)	fungo	proteases	8	0,3	67,2	4,7	Peg/citrato

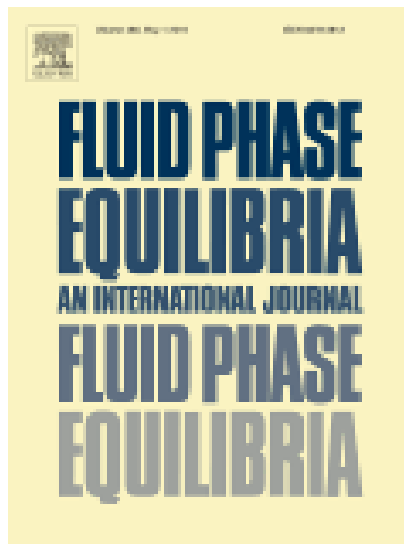
a- K (Coeficiente de partição); b- Y (Rendimento); c- Fp (Fator de purificação).

**Recovery, separation and partial purification of collagenolytic proteases
from fish residues: comparative study partitioning two-phase and precipitation
techniques**

Este artigo será adaptado e submetido ao periódico:

Fluid Phase Equilibria

Impacto: 2.280



**3 ARTIGO - Recovery, separation and partial purification of collagenolytic proteases
from fish residues: comparative study partitioning two-phase and precipitation
techniques**

Jessica Costa da Silva^a, Luiz Henrique Svintiskas Lino^{a,b}, Márcia Nieves Carneiro da Cunha^a
Ranilson de Souza Bezerra^b, Vagne de Melo Oliveira^a, Ana Lúcia Figueiredo Porto^a

^aLaboratório de Tecnologia de Produtos Bioativos, Departamento de Morfologia e Fisiologia
Animal, DMFA, Universidade Federal Rural de Pernambuco, Av. Dom Manoel, de
Medeiros, s/n, 52171-900, Recife, PE, Brazil.

^bLaboratório de Enzimologia, Departamento de Bioquímica, Universidade Federal de
Pernambuco, Cidade Universitária, 50670-420, Recife, PE, Brazil.

E-mail addresses: analuporto@yahoo.com.br (A.L.F. Porto).

Autor de Correspondência: Tel: + 55 (81) 3320.634

ABSTRACT

Collagenolytic protease was recovered and partially purified by the use of precipitation techniques (acetone, ethanol and ammonium sulfate $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$) and liquid-liquid extraction (LLE) from fish by-products (intestine). The intestinal viscera presented greater proteolytic (173.7 U/ml) and collagenolytic activity (102.41 U/mg). The precipitated residue presented higher collagenolytic activity under the conditions of 90% acetone (246.92 U/mg; y: 15.11%; PF: 0.84) and 30% ethanol (86.81 U/mg; y: 24.12%; PF: 2.41). The enzymatic extract presented relevant activity in the 60-90% fractionation (54.54 U/mg; y: 11.18%; PF: 0.53) in $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$. The crude intestinal extract was partitioned through the formation of a biphasic system was obtained by mixing polyethylene glycol (PEG-400, PEG-3350 and PEG-8000) and citrate salt at different concentrations according to a 2^4 factorial design in which PEG molar mass (M_{PEG}), PEG concentration (C_{PEG}), citrate salt concentration (C_{PHOS}) and pH were selected as the independent variables, and purification factor (PF), partition coefficient (K) and activity yield (Y) as the responses. The highest PF (8.24) was obtained at pH 6.0, 12.5% (w/w) PEG 8000 and 20.0% (w/w) citrate, while the highest recovery (195.2 %) was obtained at pH 6.0, 20.0% (w/w) PEG 1500 and 15.0% (w/w) citrate, being used for optimization. The best results of this partial purification were obtained by partitioning, suggesting the use of this technique as an alternative for the recovery of high value-added compounds derived from fish, mainly collagenolytic protease highly desired by the world enzyme market.

Keywords: ATPS; Partitioning; Protease; fish.

RESUMO

A protease collagenolítica foi recuperada e parcialmente purificada por diferentes técnicas de precipitação (acetona, etanol e sulfato de amônio $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$) e extração líquido-líquido (LLE) de subprodutos de peixes (intestino). As vísceras intestinais apresentaram maior atividade proteolítica (173,7 U / ml) e collagenolítica (102,41 U / mg). O resíduo precipitado apresentou maior atividade collagenolítica nas condições de 90% de acetona (246,92 U / mg; y : 15,11%; PF: 0,84) e 30% de etanol (86,81 U / mg; y : 24,12%; PF: 2,41). O extrato enzimático apresentou atividade relevante no fracionamento de 60-90% (54,54 U / mg; y : 11,18%; PF: 0,53) em $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$. O extrato intestinal bruto foi particionado através da formação de um sistema bifásico obtido pela mistura de polietilenoglicol (PEG-400, PEG-3350 e PEG-8000) e sal de citrato em diferentes concentrações, de acordo com um planejamento fatorial 2⁴ em que a massa molar do PEG (MPEG), concentração de PEG (CPEG), concentração de sal de citrato (CPHOS) e pH foram selecionadas como variáveis independentes; fator de purificação (PF), coeficiente de partição (K) e rendimento de atividade (Y) como respostas. O maior PF (8,24) foi obtido a pH 6,0, 12,5% (p / p) de PEG 8000 e 20,0% (p / p) de citrato, enquanto a maior recuperação (195,2%) foi obtida a pH 6,0, 20,0% (p / p). w) citrato de PEG 1500 e 15,0% (p / p), sendo utilizado para otimização. Os melhores resultados dessa purificação parcial foram obtidos por particionamento, sugerindo o uso dessa técnica como alternativa para a recuperação de compostos de alto valor agregado derivados de peixes, principalmente protease collagenolítica, altamente desejada pelo mercado mundial de enzimas.

Palavras-chave: ATPS; Particionamento; Protease; peixe.1. Introduction

INTRODUCTION

Protease recovery has become a source of great importance for the development of biotechnological development, including solid residues from fish that are disposed of inappropriately and aggressively to the environment [1,2]. From these residues, fins, scales, bones, dentin, skin, viscera, intestinal, among others for the extraction of different sources of biomolecules, among them the enzyme collagenase, which has several applications in various industrial sectors, can be applied in the pharmaceutical, food, detergent, leather, production of cosmetics, healing process, osteoporosis, among others [2,3]. For this application to be efficient, the collagenase enzyme must be purified. This purification can be through the Aqueous Two Phase System (SDEA), has a high potential in industrial applications, different factors such as: efficiency, low cost, benefit, speed, less aggressive to the environment, large-scale production. This work aims to recover collagenolytic activities of fish by-products using precipitation and partitioning techniques from the aqueous Two-Phase System.

2. Materials and methods

Residues (intestine) of Common snook (*Centropomus undecimalis*) were obtained from fishermen of the Municipality of Recife, Pernambuco, Brazil. The material was refrigerated and taken to the Laboratory of Bioactive Product Technology, Recife, Brazil, for processing and production of the crude extract.

2.1 Preparation of crude extract

For the production of the crude extract of Common snook (*C. undecimalis*), intestine residues were used, in a 1:5 (w/v) ratio of tissue to extraction buffer (0.05 M Tris-HCl pH 7.5, containing 5 mM CaCl_2) (Sigma, St. Louis, MO, USA). After maceration, the suspension was homogenized for 5 min at 12 rpm and 4°C, at time intervals of 5 min., using a homogenizer, model RW 20 S32 (IKA, Guangzhou, China). The homogenate was centrifuged for 30 min. at 12,000 x g and 4°C with a Sorvall Superspeed Centrifuge RC-6 (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA). The extract produced was warmed (45°C, 30 min.), and then centrifuged again (12,000 x g, 10 min., 4°C) (Oliveira et al., 2017a). The final material was defined as crude extract used for the partial purification steps.

2.2 Protein dosage

The protein content either of the crude extract or the purified protease was determined by the bicinchoninic acid (BCA) method (Smith et al., 1985).

2.3 Proteolytic activity

The protease activities were assayed using azocasein as substrate, using micro plates and the ELISA reader. In duplicate, using micro centrifuge tubes, 50µl of 1% (w/v) azocasein (Sigma), prepared in 0.2 M Tris-HCl pH 7.2, was incubated with 30µl of crude extract for 60min at 25°C. 240µL of 10% (w/v) trichloroacetic acid (TCA) were then added to stop the reaction. After 15min at rest, the tubes were centrifuged for 5min at 8,000xg. 70µl of the supernatant were then added to 130µl of 1 M NaOH on an ELISA plate, and the absorbance of the mixture measured in an ELISA reader (Bio-rad 550) at 450nm against a blank prepared in the same way, replacing the crude extract with 0.9 % (w/v) NaCl. Previous experiments showed that under the conditions described above, the first 60min of the reaction follow first order kinetics. One unit (U) of enzyme activity was defined as the amount of enzyme able to hydrolyze azocasein giving an increase of 0.001 units of absorbance per minute (Alencar et al., 2003).

2.4 Collagenolytic activity

The collagenolytic activity was determined using Azo dye-impregnated collagen (azocoll, Sigma, St. Louis, MO, USA) as the substrate after 5 successive cycles of washing with the extraction buffer and centrifugation (10,000 x g, 5 min., 4°C) (Oliveira et al., 2017a).

2.4.1 Partial purification

Precipitation with organic solvents

Precipitation with acetone and ethanol was performed at concentrations of 30, 60 and 90% solvent. For this, 3 mL of enzyme extract, homogenized with the solvent, was used and incubated at 4°C for 10 minutes. The samples were then centrifuged for 10 minutes at 10,000 rpm. The precipitate was resuspended in 1 ml of Tris-HCl, serving as material for analytical dosages.

2.4.2 Precipitation by ammonium sulphate

Precipitation with ammonium sulfate was performed at concentrations of 0-30%, 30-60% and 60-90%. The salt was slowly added under stirring and cooling. After, the material was dialyzed and the pre-purified extract was used for analytical dosages.

2.4.2 Partitioning by two-phase system

A solution of concentrated citrate salts (30% mm) was prepared by mixing sodium citrate and citric acid to obtain pH 6.0; 7.0 and 8.0. The solutions were placed in 15mL graduated tubes and added with Polyethylene glycol (PEG). After the procedure the tubes were homogenized within 1 minute in the vortex so that the composition was homogenized. The PEG and Sal concentrations and the PEG molar masses in each system varied according

to the factorial planning 2^4 presented in the factorial planning (**Table 1**). The system was loaded with 2g of crude sea bass extract *C. undecimalis*. After addition of the crude extract vortexing stand for 60 min. at room temperature, for separation of the phases. The volumes of the Salt and PEG phases were measured and, aliquots of each phase were collected separately and used to determine the collagenolytic activity and protein concentration for subsequent calculation of the response variables: partition coefficient (K), purification factor (FP) and recovery (Y). After the experiments, the statistical analysis of the data was performed using the Statistica 8.0 program (STATSOFT INC, 2008).

2.5.4 Sensitivity to inhibitors

To carry out the sensitivity test for natural and synthetic inhibitors, 500 µl of 500 µl extract of one of the inhibitors BENZ (Benzamidine), EDTA (ethylenediaminetetraacetic acid), PMSF (Phenylmethylsulfonylfluoride), TLCK (Tosyl lysine chloromethyl ketone), TLCK (Tosyl phenylalanyl chloromethyl ketone), homogenized and allowed to stand for a period of 30 minutes. After this period, 500 µl of this mixture was removed and then the collagenolytic activity was performed.

2.5.5 Partition Coefficient (K), Enzyme Recovery (Y), and Purification Factor

The collagenolytic activity was calculated between the salt and peg phases, is shown by the coefficient partition (K) from the formula:

$$K = \frac{Ac_s}{Ac_i}$$

"Acs" and "Aci" are represented by collagenolytic activities (U / mL) in the upper phase

The recovery (Y) of PEG phase collagenolytic protease was calculated from the formula:

$$Y = \frac{V_s \cdot Ac_s}{V_{inic} \cdot Ac_{inic}} \times 100$$

The purification factor (PF) was calculated from the formula:

$$FP = \frac{Ac_s/Ps}{Ac_{inic}/Prot_{inic}}$$

Acs" and "Ps" are collagenolytic activities (U / mL) in the upper phase and protein concentration (mg / mL) in the upper phase. "Ac init" and "Prot init" are collagenolytic activity (initial U / mL) and initial protein concentration (mg / mL).

3. Results and discussion

3.1 Precipitation

After the selection stage of the target species, precipitations were performed with the solvents (acetone, ethanol and ammonium sulfate salt) at different concentrations. From the results obtained, it was observed that the precipitation using acetone at 90% concentration resulted in higher yield (Y: 246.92) and purification factor (PF: 2.41) as described in **Table 2**. A study by Daboor (2012) reports that precipitation by the method (Sphadex-100) presented a higher degree of purification compared to other types of purification.

3.2 Two-phase partitioning

The crude extract of *C. undecimalis* was partitioned through an experimental design in the SDFA, with factorial design of 2^4 in which different types of independent variables were analyzed: molar mass concentration of polyethylene glycol (MMPEG/g/mol) concentrations of salts of citrate (CCTI/%w/w), concentration of the polymer - polyethylene glycol (CPEG/%w/w) and pH (6, 7 and 8). The results obtained in the experimental design are presented in **Table 3**. In the tests 1, 3, 9 and 11, it was not possible to observe the formation of phases. According to Padilha et al. (2011), the low concentration of the components of these tests was not sufficient for the separation of the phases, since the concentrations are below the binodal curve of this biphasic system. The partition coefficient response variable (K) is determined by the ratio of the activity of the upper phase to the activity of the lower phase, and indicates the phase in which the biomolecule has higher affinity. In the results obtained the values of the partition coefficient were higher than one ($K > 1$) in all the tests, indicating that the enzyme has higher affinity for the upper phase of the system (rich in PEG), as shown in **table 3**.

Studies carried out by Lima et al. (2013), Wanderley et al. (2016) show that the collagenolytic enzyme has been partitioned to the phase (PEG), although in these studies they have performed by different types of organism. In relation to yield values, *C. undecimalis* presented higher yield. Studies carried out by Lima et al. (2013) and Silva et al. (2018) show the PF value below 3.8 and the yield below 195.2. Studies carried out by Porto et al. (2006) show that PF is (47.7), we can take into account that the molar mass of PEG was 10000. The assay was carried out with a high purification factor (PF) of (3.91), partition coefficient (0.63) and yield coefficient (326.52%) shown in (**table 3**). From the studies conducted by the authors (Yavari et al., 2013, Maciel et al., Poosin et al., 2014; Silva et al., 2018) show the PF value below 3.8. The main and interaction effects of the complete factorial planning 2^4 in relation to the purification factor of the PEG phase can be

observed in **figure 1**. The independent variable that influenced positively the PF was the molar mass of the PEG (M_{MPEG}), following the influence the concentration of this polymer. The interaction between the M_{MPEG} , C_{PEG} and pH variables was also significant for obtaining PF, being positive. The effect of the interaction between the three variables can be observed in **figure 2**. Some trials presented recovery values (Y) close to or greater than 100%, indicating the feasibility of the use of SDFA as a technique of pre-purification of collagenolytic enzymes obtained from *C. undecimalis*. Obtaining enzymes by the two-phase system recovery method is simple, as well as being a low-cost alternative for the industries that work with biomolecules. Our results are now compared with those reported for traditional chromatographic techniques to have an idea of the economic potential of the proposed ATPS. Collagenolytic enzyme from filefish (*Novoden modestrus*) by precipitation with ammonium sulfate (PF = 1.27 and Y = 64.30%) and then subjected it to three chromatographic methods, obtaining only in the second step of the process, with DEAE-Sephadex A-50, results comparable to those of the present study (PF = 8.60, Y = 38.16%) (Kim et al., 2002). Purified a collagenolytic protease from *Thunnus thymus* pyloric caeca by acetone precipitation (PF = 2.6, Y = 2.90%) and three chromatographic methods, obtaining only with Sephadex G 100 gel chromatography a PF value (8.4) close to that of the present study, but a much lower Y value (0.26%) (Byun et al., 2002). Purified a collagenase from winter flounder (*Pseudopleuronectes americanus*) muscle by precipitation with $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, (PF = 1.54, Y = 76.85%) and ion exchange chromatography (PF = 5.81, Y = 17.18%) (Teruel and Simpson, 1995), while purified a collagenase from *Nocardiosis dassonvillei* NRC2aza by precipitation with the same salt (PF = 4.6, Y = 60.88%) and Sephacryl S-200 (PF = 5.0, Y = 9.3%) and DEAE/Sepharose (PF = 6.23, Y = 3.3%) chromatographies (Abood et al., 2018). Resuming, according to the literature in this field, most of the conventional chromatographic methods were less performant than our liquid-liquid extraction by ATPS in the recovery of collagenolytic enzymes from fish processing residues, especially *C. undecimalis*.

3.3 Sensitivity of PEG-collagenolytic protease to inhibitors

After the partitioning step, the samples were submitted to sensitivity to natural and synthetic inhibitors. The extracts of the *C. undecimalis* showed a marked reduction in activity when subjected to benzamidine (22.51 ± 0.02^b), TLCK (21.05 ± 0.01^b), TPCK (21.29 ± 0.02^b) and PMSF (23.08 ± 0.00^b), 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 weakly *C. leiarchus* (Oliveira et al., 2017).

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 Kim et al. (2002), Park et al. (2002) and Oliveira et al. (2017).

4. Conclusions

This article provides a useful protocol for partial purification of fish collagenolytic proteases using aqueous two phase system and precipitation methods efficiently, mainly in the fractions of 90% acetone, 60% ethanol and 60-90% ammonium sulfate. The developed protocol appears to function well than current method with cost effective and simple way utilizing chromatography. The enzyme was obtained with 20.0% PEG 8000 and 15.0% citrate at pH 6.0, resulting in a PF: 3.80, suggesting the use of technique as an alternative to recovery of fish by-products, mainly of collagenolytic enzyme that are highly desired by the global market of enzymes, for applications where high degree of purity of the protease is not required, as in leather treatment and tissue dyeing segments, for example.

5. Acknowledgements

This study was granted in part by the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – PNPD Grant number: 8888.119817/2016-01.

6. References

- [1] V.M. Oliveira.; M.N. Carneiro-Cunha, M.N.; C.R.D, Assis.; T.P, Nascimento.; P. N, HERCULANO.; M.T.H, Cavalcanti.; A. L. F, Porto. Colagenases de pescado e suas aplicações industriais. Pubvet, v.11, n.3, p. 243-255, 2017c.
- [2] V.M , Oliveira.; , M.N, Carneiro-Cunha; T.P, Nascimento.; C.R.D, Assis.; R.S, Bezerra.; A.L.F , Porto. Collagen: general characteristics and production of bioactive peptides a review-with emphasis on byproducts of fish. ActaFish, v. 5, n.2, p. 70-82, 2017d.
- [3] V.M. Oliveira.; T.P, Nascimento; C.R.D, Assis.; R.S, Bezerra.; A.L.F , Porto. Study on enzymes of industrial interest in digestive viscera: Greater amberjack (*Seriola dumerili*). Journal of Coastal Life Medicine, v.5, n.6, p.233-238, 2017b.
- [4] V.M. Oliveira.; C.R.D, Assis.; J.C, Silva, Q. J, Silva.; R.S, Bezerra.; A. L. F, Porto, 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.

[5] V.M. Oliveira.; C.R.D, Assis.; P. N, Herculano, M. T. H, Cavalcanti. Purification, characterization and and collagen specificity test for industrial application. Boletim and collagen specificity test for industrial application. Boletim do. Instituto de Pesca, v. 43, n.1, p. 52- 64, 2017a.

[6] M. C. A. Wanderley; J. M. W. D, Neto; C. A , Lima, S. I. C, Silverio; S. I. C, Filho, J. L. L. F, Teixeira,; A. L. F, Porto. Production and Characterization of Collagenase by *Penicillium* sp. UCP 1286 Isolated From Caatinga Soil. Journal of Applied Biology & Biotechnology, v.4 n. 4, p. 01-10, 2016.

[7] M.C.A. Wanderley; J.M.W. Duarte Neto, W.W.C. Albuquerque, D.A.V. Marques, C.A. Lima, S.I.C. Silverio, J.L. Lima Filho, J.A.C. Teixeira, A.L.F. Porto, Purification and characterization of a collagenase from *Penicillium* sp. UCP 1286 by polyethyleneglycol phosphate aqueous two-phase system, Protein Expression Purif.133 (2017) 8-14.

[8] R. B Alencar, M. M, Biondi, P. M.G, Paiva, V. L. A, Vieira, L. B, Carvalho Jr, R. D. S, Bezerra.2003. Alkaline proteases from digestive tract of four tropical fishes. Brazilian Journal of Food Technology6:279-84.

[9] P.K. Smith, R.I. Krohn, G.T. Hermanson, A.K. Mallia, F.H. Gartner, M.D. Provenzano, E.K. Fujimoto, N.M. Goeke, B.J. Olson, D.C. Klenk, Measurement of protein using bicinchoninic acid, Anal. Biochem.150 (1985) 76–85.

[10] A.L. Grilo, M. R. Aires-Barros, A.M. Azevedo, Partitioning in Aqueous Two-Phase Systems: Fundamentals, Applications and Trends, Sep. Purif. Rev. 45 (2016) 68-80.

[11] C.A. Lima, A.C.V. Freitas Jr, J.L. Lima Filho, A. Converti, M.G. Carneiro-da-Cunha, A.L.F. Porto. Two-phase partitioning and partial characterization of a collagenase from *Penicillium aurantiogriseum* URM4622: Application to collagen hydrolysis, Biochem. Eng. 75 (2013) 64–71.

[12] C.A.S. Ruiz, C.V.D. Berg, R.H. Wijffels, M.H.M. Eppink , Rubisco separation using biocompatible aqueous two-phase systems, Sep. Purif. Technol. 196 (2018) 254–261.M.

[13] Yavari, G.R. Pazuki, M. Vossoughi, S.A. Mirkhani, A.A. Seifkordi, Partitioning of alkaline protease from *Bacillus licheniformis* (ATCC 21424) using PEG e K₂ HPO₄ aqueous two-phase system, Fluid Phase Equilib. 337 (2013) 1e 5.

[14] S.K. Kim, P.J. Park, J.B. Kim, F. Shahidi, Purification and Characterization of a Collagenolytic Protease from the Filefish, *Novoden modestrus*, J. Biochem. Mol. Biol. 335 (2002) 165–171.

Table 1. Experimental design 2⁴ for collagenolytic protease partition using PEG-citrate ATPS.

Variables	Levels		
	Low (-1)	Central (0)	High (+1)
^a M _{PEG} (g/mol)	400	3350	8000
^b C _{PEG} (% w/w)	20	22	24
^c C _{CCIT} (% w/w)	15	17.5	20
pH	6	7	8

^a PEG molar mass

^b PEG concentration

^c Citrate concentration

Table 2. Protein precipitation of the crude extract of *C. undecimalis*

Types of precipitation	Total Proteins (U.mg ⁻¹) ¹	Specific collagenolytic activity (U.mg ⁻¹) ¹	Yield %	Purification factor
Crude extract	2.35	43.57	100%	1
Acetone 30%	195.33	66.16	12.62	0.64
Acetone 60%	170.33	81.75	13.59	0.79
Acetone 90%	100.33	246.92	24.19	2.41
Ethanol 30%	178.25	86.81	15.11	0.84
Ethanol 60%	86.58	116.93	8.64	1.14
Ethanol 90%	112.83	78.43	9.88	0.76
Ammonia Sulphate 30%	380.33	11.30	4.19	0.11
Ammonia Sulphate 60%	380.75	31.31	11.64	0.30
Ammonia Sulphate 60%	209.91	54.54	11.18	0.53

Table 3. Matrix of the full factorial design (2⁴) with conditions and results of the collagenolytic protease partition.

Ensaio	M _{PEG} ^a (g/mol)	C _{PEG} ^b (%)	C _{CIT} ^c (%)	pH	K ^d	Y ^e (PEG)	FP ^f
1 ^g	400	20	15	6	0	0	0
2	8000	20	15	6	9.39	236.24	3.80
3 ^g	400	24	15	6	0	0	0
4	8000	24	15	6	13.17	220.07	0.30
5	400	20	20	6	0,635	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 ^g	400	20	15	8	0	0	0
10	8000	20	15	8	2.43	94.98	0.44
11 ^g	400	24	15	8	0	0	0
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	3350	22	17.5	7	2.74	63.64	0.30
18	3350	22	17.5	7	8.43	164.26	1.23
19	3350	22	17.5	7	9.39	200.07	1.18
20	3350	22	17.5	7	7.78	179.65	1.20

^a PEG molar mass

^b PEG concentration

^c Citrate concentration

^d Partition coefficient

^e Yield

^f Purification factor

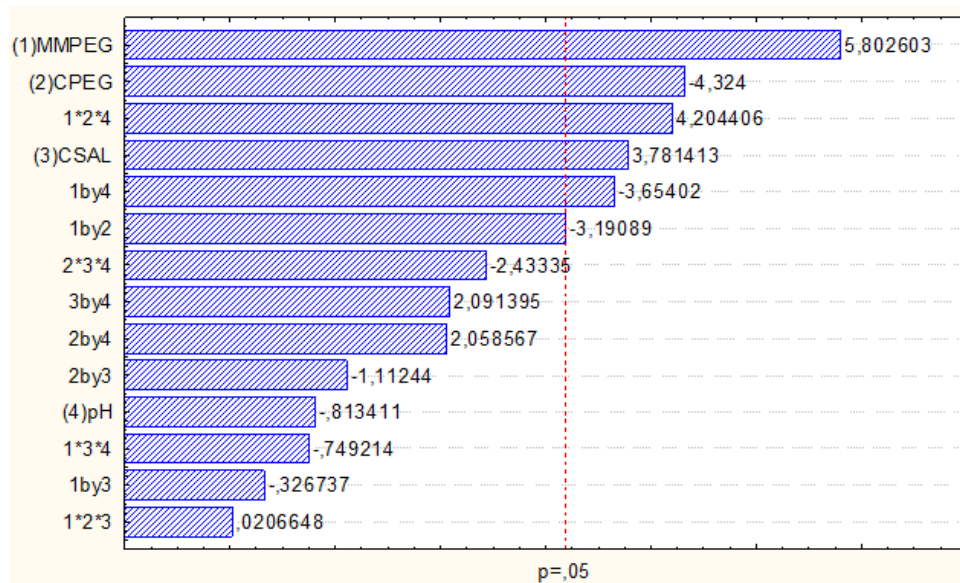
^h No phase formation after addition of extract.

Figure captions

Figure 1. Pareto chart of standardized effects of the factors. (1) PEG_{MM}: polyethylene glycol molar mass; (2) C_{PEG} %: polyethylene glycol concentration; (3) pH: pH factor; (4) CCIT%: phosphate concentration on the variable in 2⁴-full factorial design 1 by 2, 3, 4; 3 by 4; 2 by 3, 4 are the interaction effects between the factors.

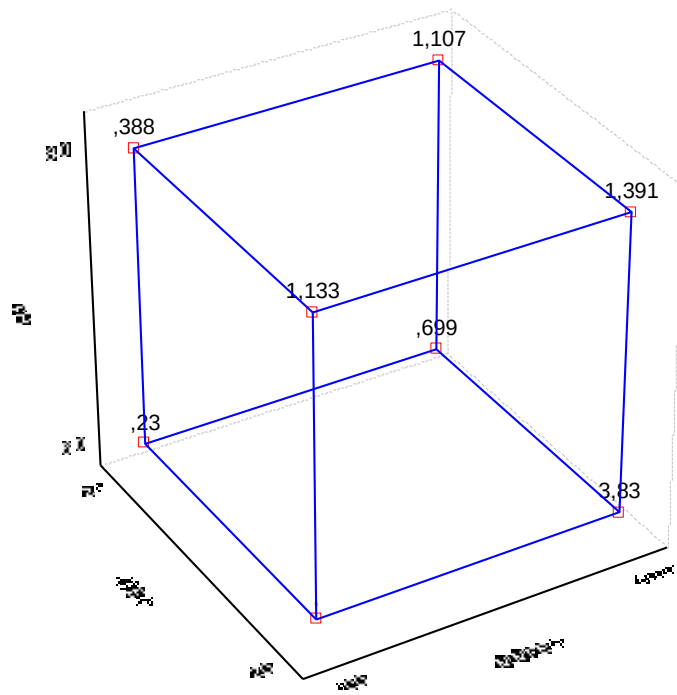
Figure 2. Simultaneous effect of the interaction of PEG molar mass (M_{MPEG}), PEG concentration (C_{PEG}) and pH under the variable factor purification factor (PF).

Figure 1



364
365
366

Figure 2



367

4 CONCLUSÃO

Das espécies selecionadas todas apresentaram potencialidade, entretanto a do robalo-flexa (*C. undecimalis*) foi selecionada como espécie-alvo para toda parte analítica usando técnicas simples de precipitação em solventes orgânicos e através do uso de particionamento em sistema bifásico.

O fracionamento proteico por acetona, etanol e sulfato de amônia mostrou-se eficiente, todavia, os dois primeiros se apresentaram em melhores condições para uso em que a protease não precisa estar com alto grau de purificação, mas com alta atividade específica, como no tingimento de tecidos e no tratamento do couro.

No concernente ao particionamento usando PEG/citrato, os dados sugerem potencialidade através do uso desta técnica para obtenção/extração de uma protease com maior grau de pureza, como o requerido para a produção de peptídeos de colágeno.

Assim, observamos que as técnicas de precipitação e fracionamento por partição usando PEG/citrato são altamente recomendadas para a recuperação e purificação parcial de proteases colagenolíticas extraídas de resíduos do pescado processado com potencial uso biotecnológico em experimentos futuros.

REFERÊNCIAS

AMÉRICO, M.; AMORIM, B.; CRISTO, G.; VALLE, J. B.; SALGADO, J. S. Práticas de processamento e aproveitamento de subprodutos de pescado para agregação de valor, comercialização e geração de renda para agricultores familiares do Norte do Espírito Santo. **Cadernos de Agroecologia**, v. 8, n. 2, 2013.

AMID, M., MANAP, M., HUSSIN, M., & MUSTAFA, S. A Novel Aqueous Two Phase System Composed of Surfactant and Xylitol for the Purification of Lipase from Pumpkin (*Cucurbita moschata*) Seeds and Recycling of Phase Components. *Molecules*. **Molecules**, v.20, n.6, p.11184–11201, 2015.

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.

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.

CHANDIKA, P., KO, S.-C., OH, G.-W., HEO, S.-Y., NGUYEN, V.-T., JEON, Y.-J., LEE, B., JANG, C. H., KIM, G. & PARK, W. S. Fish collagen/alginate/chitooligosaccharides integrated scaffold for skin tissue regeneration application. **International journal of biological macromolecules**, 81, 504-513, 2015.

GEROSA, T.; PIERRART, J.; SERANE-FRESNEL, J.; AMSALLEM, L.; MASMEJEAN, E. H. (2018). *Distal sensory disorders in Dupuytren's disease*. **Orthopaedics & Traumatology: Surgery & Research**, n. 6, v.104, p.897–900, 2018.

GUILHEN, T. A.; VIEIRA, A. B. M.; CASTRO, CASTRO, M. C.; HIRATA, H. H.; MACHADO, I. R. Avaliação do tratamento cirúrgico da doença de Dupuytren pela técnica da palma aberta modificada. **Revista Brasileira de Ortopedia**, n.1; v.49, p.31-36, 2014.

MANSUR, H. G.; OLIVEIRA, E. R.; GONÇALVES, C. Análise epidemiológica dos pacientes com doença de Dupuytren. **Revista Brasileira de Ortopedia**, n. 1, v.49; p.10–14, 2018.

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.

OLIVEIRA, V. M.; ASSIS, C. R. D.; HERCULANO, P. N.; CAVALCANTI, M. T. H.; BEZERRA, R.S.; PORTO, A. L.F. 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, 2017a.

OLIVEIRA, V.M.; NASCIMENTO, T.P.; ASSIS, C.R.D.; BEZERRA, R.S.; PORTO, A.L.F. Study on enzymes of industrial interest in digestive viscera: Greater amberjack (*Seriola dumerili*). **Journal of Coastal Life Medicine**, v.5, n.6, p.233-238, 2017b.

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, 2017c.

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, 2017d.

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.

MPA – Ministério da Pesca e Aquicultura. **Boletim estatístico da pesca e aquicultura**. 129p., 2013.

PESSOA JÚNIOR, ADALBERTO; KILIKIAN, BEATRIZ VAHAN. **Purificação de produtos biotecnológicos**, p. 96. Bueri, SP: Manole, 2005.

ROSSO, B. U.; LIMA, C. DE A.; PORTO, T. S.; DE OLIVEIRA NASCIMENTO, C., PESSOA, A.; CONVERTI, A.; PORTO, A. L. F. Partitioning and extraction of collagenase from *Penicillium aurantiogriseum* in polyethylene glycol)/phosphate aqueous two-phase system. **Fluid Phase Equilibria**, v.335, p. 20–25, 2012.

SANJUAN-CERVERÓ, R.; VAZQUEZ-FERREIRO, P.; GOMEZ-HERRERO, D.; CARRERA-HUESO, F. J. Efficacy of Collagenase *Clostridium Histolyticum* for Dupuytren Disease: A Systematic Review. **Revista Iberoamericana de Cirugía de la Mano**, v. 45, p. 70–88, 2017.

TALLIS, A., MOTLEY, T. A., WUNDERLICH, R. P., DICKERSON, J. E., WAYCASTER, C., & SLADE, H. B. Clinical and Economic Assessment of Diabetic Foot Ulcer Debridement with Collagenase: Results of a Randomized Controlled Study. **Clinical Therapeutics**, v. 35, n.11, p. 1805–1820, 2013.

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.

ANEXOS A - NORMAS DA REVISTA

Article structure

Subdivision - numbered sections

Divide your article into clearly defined and numbered sections. Subsections should be numbered 1.1 (then 1.1.1, 1.1.2, ...), 1.2, etc. (the abstract is not included in section numbering). Use this numbering also for internal cross-referencing: do not just refer to 'the text'. Any subsection may be given a brief heading. Each heading should appear on its own separate line.

Introduction

State the objectives of the work and provide an adequate background, avoiding a detailed literature survey or a summary of the results.

Materials and Methods

Provide sufficient detail to allow the work to be reproduced. In the case of experimental papers the numerical purity (mass fraction or mole fraction) of the investigated substances should be indicated, as well as the method of purity determination, if known. Any subsequent purification of the sample, such as distillation, crystallization, drying, etc., should be described.

Methods already published should be indicated by a reference: only relevant modifications should be described.

Theory/calculation

A Theory section should extend, not repeat, the background to the article already dealt with in the Introduction and lay the foundation for further work. In contrast, a Calculation section represents a practical development from a theoretical basis.

Results

Results should be clear and concise.

Discussion

This should explore the significance of the results of the work, not repeat them. A combined Results and Discussion section is often appropriate. Avoid extensive citations and discussion of published literature.

Conclusions

The main conclusions of the study may be presented in a short Conclusions section, which may stand alone or form a subsection of a Discussion or Results and Discussion section.

Appendices

If there is more than one appendix, they should be identified as A, B, etc. Formulae and equations in appendices should be given separate numbering: Eq. (A.1), Eq. (A.2), etc.; in a subsequent appendix, Eq. (B.1) and so on. Similarly for tables and figures: Table A.1; Fig. A.1, etc.

Nomenclature

Authors must provide a Nomenclature, to be published between the text of the paper and the list of references. The Nomenclature should be a list of all mathematical symbols in one column and their definitions with units, preferably including the equation number of first use, in an

adjacent column. The symbols should follow the notation of the IUPAC, “Quantities, Units, and Symbols in Physical Chemistry, 2nd Ed.”, http://old.iupac.org/publications/books/gbook/green_book_2ed.pdf. In addition, all unusual abbreviations and acronyms used in the paper should be included in the Nomenclature. Authors should also consider defining symbols and acronyms when first used within the paper.

Essential title page information

- **Title.** Concise and informative. Titles are often used in information-retrieval systems. Avoid abbreviations and formulae where possible.
- **Author names and affiliations.** Please clearly indicate the given name(s) and family name(s) of each author and check that all names are accurately spelled. Present the authors' affiliation addresses (where the actual work was done) below the names. Indicate all affiliations with a lower-case superscript letter immediately after the author's name and in front of the appropriate address. Provide the full postal address of each affiliation, including the country name. If an institutional affiliation is given for an author, a corresponding institutional e-mail address will need to be provided, otherwise the manuscript will not be considered for publication. Next to the institutional e-mail address a personal e-mail address may be provided for each author as a secondary address.
- **Corresponding author.** Clearly indicate who will handle correspondence at all stages of refereeing and publication, also post-publication. Note that the corresponding author needs to be a senior member of the research team and not a student. Ensure that an institutional e-mail address is given if the corresponding author is affiliated to an institute, and that contact details are kept up to date by the corresponding author.
- **Present/permanent address.** If an author has moved since the work described in the article was done, or was visiting at the time, a 'Present address' (or 'Permanent address') may be indicated as a footnote to that author's name. The address at which the author actually did the work must be retained as the main, affiliation address. Superscript Arabic numerals are used for such footnotes.

Highlights

Highlights are optional yet highly encouraged for this journal, as they increase the discoverability of your article via search engines. They consist of a short collection of bullet points that capture the novel results of your research as well as new methods that were used during the study (if any). Please have a look at the examples here: [example Highlights](#).

Abstract

A concise and factual abstract is required. The abstract should state briefly the purpose of the research, the principal results and major conclusions. An abstract is often presented separately from the article, so it must be able to stand alone. For this reason, References should be avoided, but if essential, then cite the author(s) and year(s). Also, non-standard or uncommon abbreviations should be avoided, but if essential they must be defined at their first mention in the abstract itself.

Graphical abstract

Although a graphical abstract is optional, its use is encouraged as it draws more attention to the online article. The graphical abstract should summarize the contents of the article in a concise, pictorial form designed to capture the attention of a wide readership. Graphical abstracts should be submitted as a separate file in the online submission system. Image size: Please provide an

image with a minimum of 531×1328 pixels (h $\times$ w) or proportionally more. The image should be readable at a size of 5×13 cm using a regular screen resolution of 96 dpi. Preferred file types: TIFF, EPS, PDF or MS Office files. You can view Example Graphical Abstracts on our information site.

Authors can make use of Elsevier's Illustration Services to ensure the best presentation of their images and in accordance with all technical requirements.

Highlights

Highlights are a short collection of bullet points that convey the core findings of the article. Highlights are optional and should be submitted in a separate file in the online submission system. Please include 3 to 5 bullet points (max. 85 characters per bullet point including spaces). See <https://www.elsevier.com/researchhighlights> for examples.

Note: for Asian authors, interpreting a character as a word, max 85 characters per bullet point corresponds with approx. 20 words max per bullet point.

Keywords

Immediately after the abstract, provide a maximum of 5 keywords, using American spelling and avoiding general and plural terms and multiple concepts (avoid, for example, "and", "of"). Be sparing with abbreviations: only abbreviations firmly established in the field may be eligible. These keywords will be used for indexing purposes.

Acknowledgements

Collate acknowledgements in a separate section at the end of the article before the references and do not, therefore, include them on the title page, as a footnote to the title or otherwise. List here those individuals who provided help during the research (e.g., providing language help, writing assistance or proof reading the article, etc.).

Formatting of funding sources

List funding sources in this standard way to facilitate compliance to funder's requirements:

Funding: This work was supported by the National Institutes of Health [grant numbers xxxx, yyyy]; the Bill & Melinda Gates Foundation, Seattle, WA [grant number zzzz]; and the United States Institutes of Peace [grant number aaaa].

It is not necessary to include detailed descriptions on the program or type of grants and awards. When funding is from a block grant or other resources available to a university, college, or other research institution, submit the name of the institute or organization that provided the funding.

If no funding has been provided for the research, please include the following sentence:

This research did not receive any specific grant from funding agencies in the public, commercial, or not-for-profit sectors.

Nomenclature and units

Follow internationally accepted rules and conventions: use the international system of units (SI). If other quantities are mentioned, give their equivalent in SI. You are urged to consult IUPAC: Nomenclature of Inorganic Chemistry for further information.

Math formulae

Please submit math equations as editable text and not as images. Present simple formulae in line with normal text where possible and use the solidus (/) instead of a horizontal line for small fractional terms, e.g., X/Y. In principle, variables are to be presented in italics. Powers of e are often more conveniently denoted by exp. Number consecutively any equations that have to be displayed separately from the text (if referred to explicitly in the text).

Footnotes

Footnotes should be used sparingly. Number them consecutively throughout the article. Many word processors build footnotes into the text, and this feature may be used. Should this not be the case, indicate the position of footnotes in the text and present the footnotes themselves separately at the end of the article.

Artwork

Image manipulation

Whilst it is accepted that authors sometimes need to manipulate images for clarity, manipulation for purposes of deception or fraud will be seen as scientific ethical abuse and will be dealt with accordingly. For graphical images, this journal is applying the following policy: no specific feature within an image may be enhanced, obscured, moved, removed, or introduced. Adjustments of brightness, contrast, or color balance are acceptable if and as long as they do not obscure or eliminate any information present in the original. Nonlinear adjustments (e.g. changes to gamma settings) must be disclosed in the figure legend.

Electronic artwork

General points

- Make sure you use uniform lettering and sizing of your original artwork.
- Preferred fonts: Arial (or Helvetica), Times New Roman (or Times), Symbol, Courier.
- Number the illustrations according to their sequence in the text.
- Use a logical naming convention for your artwork files.
- Indicate per figure if it is a single, 1.5 or 2-column fitting image.
- For Word submissions only, you may still provide figures and their captions, and tables within a single file at the revision stage.
- Please note that individual figure files larger than 10 MB must be provided in separate source files.

A detailed guide on electronic artwork is available.

You are urged to visit this site; some excerpts from the detailed information are given here.

Formats

Regardless of the application used, when your electronic artwork is finalized, please 'save as' or convert the images to one of the following formats (note the resolution requirements for line drawings, halftones, and line/halftone combinations given below):

EPS (or PDF): Vector drawings. Embed the font or save the text as 'graphics'.

TIFF (or JPG): Color or grayscale photographs (halftones): always use a minimum of 300 dpi.

TIFF (or JPG): Bitmapped line drawings: use a minimum of 1000 dpi.

TIFF (or JPG): Combinations bitmapped line/half-tone (color or grayscale): a minimum of 500 dpi is required.

Please do not:

- Supply files that are optimized for screen use (e.g., GIF, BMP, PICT, WPG); the resolution is too low.
- Supply files that are too low in resolution.
- Submit graphics that are disproportionately large for the content.

Color artwork

Please make sure that artwork files are in an acceptable format (TIFF (or JPEG), EPS (or PDF) or MS Office files) and with the correct resolution. If, together with your accepted article, you submit usable color figures then Elsevier will ensure, at no additional charge, that these figures will appear in color online (e.g., ScienceDirect and other sites) in addition to color reproduction in print. Further information on the preparation of electronic artwork.

Figure captions

Ensure that each illustration has a caption. A caption should comprise a brief title (not on the figure itself) and a description of the illustration. Keep text in the illustrations themselves to a minimum but explain all symbols and abbreviations used.

Tables

Please submit tables as editable text and not as images. Tables can be placed either next to the relevant text in the article, or on separate page(s) at the end. Number tables consecutively in accordance with their appearance in the text and place any table notes below the table body. Be sparing in the use of tables and ensure that the data presented in them do not duplicate results described elsewhere in the article. Please avoid using vertical rules and shading in table cells.

References

Citation in text

Please ensure that every reference cited in the text is also present in the reference list (and vice versa). Any references cited in the abstract must be given in full. Unpublished results and personal communications are not recommended in the reference list, but may be mentioned in the text. If these references are included in the reference list they should follow the standard reference style of the journal and should include a substitution of the publication date with either 'Unpublished results' or 'Personal communication'. Citation of a reference as 'in press' implies that the item has been accepted for publication.

Reference links

Increased discoverability of research and high quality peer review are ensured by online links to the sources cited. In order to allow us to create links to abstracting and indexing services, such as Scopus, CrossRef and PubMed, please ensure that data provided in the references are correct. Please note that incorrect surnames, journal/book titles, publication year and pagination may prevent link creation. When copying references, please be careful as they may already contain errors. Use of the DOI is highly encouraged.

A DOI is guaranteed never to change, so you can use it as a permanent link to any electronic article. An example of a citation using DOI for an article not yet in an issue is: VanDecar J.C., Russo R.M., James D.E., Ambeh W.B., Franke M. (2003). Aseismic continuation of the Lesser Antilles slab beneath northeastern Venezuela. *Journal of Geophysical Research*, <https://doi.org/10.1029/2001JB000884>. Please note the format of such citations should be in the same style as all other references in the paper

Reference style

Text: Indicate references by number(s) in square brackets in line with the text. The actual authors can be referred to, but the reference number(s) must always be given.

Example: '..... as demonstrated [3,6]. Barnaby and Jones [8] obtained a different result'

List: Number the references (numbers in square brackets) in the list in the order in which they appear in the text.

Examples:

Reference to a journal publication:

[1] J. van der Geer, J.A.J. Hanraads, R.A. Lupton, The art of writing a scientific article, *J. Sci. Commun.* 163 (2010) 51–59. <https://doi.org/10.1016/j.Sc.2010.00372>.

Reference to a journal publication with an article number:

[2] J. van der Geer, J.A.J. Hanraads, R.A. Lupton, 2018. The art of writing a scientific article. *Heliyon*. 19, e00205. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2018.e00205>.

Reference to a book:

[3] W. Strunk Jr., E.B. White, *The Elements of Style*, fourth ed., Longman, New York, 2000.

Reference to a chapter in an edited book:

[4] G.R. Mettam, L.B. Adams, How to prepare an electronic version of your article, in: B.S. Jones, R.Z. Smith (Eds.), *Introduction to the Electronic Age*, E-Publishing Inc., New York, 2009, pp. 281–304.

Reference to a website:

[5] Cancer Research UK, Cancer statistics reports for the UK. <http://www.cancerresearchuk.org/aboutcancer/statistics/cancerstatsreport/>, 2003 (accessed 13 March 2003).

Reference to a dataset:

[dataset] [6] M. Oguro, S. Imahiro, S. Saito, T. Nakashizuka, Mortality data for Japanese oak wilt disease and surrounding forest compositions, *Mendeley Data*, v1, 2015. <https://doi.org/10.17632/xwj98nb39r.1>.

Journal Abbreviations Source

Journal names should be abbreviated according to

Chemical Abstracts Service (CAS): <http://www.cas.org>

Video

Elsevier accepts video material and animation sequences to support and enhance your scientific research. Authors who have video or animation files that they wish to submit with their article are strongly encouraged to include links to these within the body of the article. This can be done in the same way as a figure or table by referring to the video or animation content and noting in the body text where it should be placed. All submitted files should be properly labeled so that they directly relate to the video file's content. In order to ensure that your video or animation material is directly usable, please provide the file in one of our recommended file formats with a preferred maximum size of 150 MB per file, 1 GB in total. Video and animation files supplied will be published online in the electronic version of your article in Elsevier Web products, including ScienceDirect. Please supply 'stills' with your files: you can choose any frame from the video or animation or make a separate image. These will be used instead of standard icons and will personalize the link to your video data. For more detailed instructions please visit our video instruction pages. Note: since video and animation cannot be embedded in the print

version of the journal, please provide text for both the electronic and the print version for the portions of the article that refer to this content.

ANEXO B - PARTICIPAÇÃO EM APRESENTAÇÃO DE TRABALHO EM EVENTO CIENTÍFICO

Simpósio Internacional de Moléculas Bioativas e Bioprocessos de Organismos Aquáticos (SIMBOA) - Rio Grande do Norte, Natal - 06 a 09 de junho de 2017

Collagenases of fish applicable in the production of bioactive collagen peptides

Jessica Costa da Silva¹, Vagne de Melo Oliveira¹, Nathália Albuquerque Roberto, Ana Lúcia Figueiredo Porto
Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal da Universidade Federal Rural de Pernambuco
(DMFA/UFRPE), Recife, Pernambuco, Brasil.

Introduction: The extraction of enzymes from fish processing residues is a viable alternative for their reuse, since in addition to minimizing the environmental impact, it becomes a renewable source of protein biomolecules. Biotechnological advances seek to improve quality and minimize. The costs for obtaining alternative sources of proteases. One of the major groups of proteases that can be obtained through fish viscera are collagenases, the only set of enzymes capable of degrading the helical region of collagen. Objectives: This work aimed to report the importance of collagenases obtained from fish processing and applicable in the industry. Material and Methods: For the accomplishment of this work a qualitative review on collagenases and their industrial applications in the production of collagen peptides was carried out. Results and Discussion: One possible technique for separating these collagenases is through the use of the two-phase aqueous system, a large-scale protein purification method that enables selective separation. Collagenolytic enzymes that have high activity and specificity, are therefore preferred for the production of these peptides for industrial applications, especially in the food and biomedical areas. Thus, recently, procedures of extraction and isolation of digestive enzymes aimed at biotechnological application in the formation of Bioactive collagen peptides have been tested. Studies that describe the enzymes isolated from these animals represent the first step in assessing their potential for biotech applications, mainly because of the need for alternative sources to meet the need for animal health. Conclusions: Therefore, fish processing residues are potential sources of enzymes capable of hydrolyzing native and commercial collagen to be applied in the production of bioactive peptides with biological functions of industrial interest.

Palavras-chaves: collagenase, indústria, peixe, peptídeos, resíduos.

ANEXO C - PARTICIPAÇÃO EM APRESENTAÇÃO DE TRABALHO EM EVENTO CIENTÍFICO

I Jornada de Biomedicina FBV DeVry- ATUALIZAÇÃO E PROMOÇÃO DA SAÚDE - Recife-PE, 24 e 25 de novembro de 2017.

ENZIMA DO PESCADO EMPREGADA NO CICATRIZAÇÃO: FONTE ALTERNATIVA E AGREGAÇÃO DE VALOR AO PRODUTO PESQUEIRO

Jessica Costa da Silva¹, Felype Thomaz de Brito Rocha², Quesia Jemima da Silva², Sabrina Roberta Santana da Silva², Vagne de Melo Oliveira²

INTRODUÇÃO: O crescimento do consumo de peixes devido ao seu alto valor nutricional, como proteínas, aminoácidos, ômega-3, entre outros, têm gerado grandes quantidades de resíduos que também podem ser extraídas enzimas de grande interesse industrial, tornando-as uma fonte rica de biomoléculas proteicas. A partir do processamento desses resíduos que são descartados de forma inadequada e com os grandes avanços biotecnológicos, curativos tem sido desenvolvido a partir das vísceras (intestino e pele) de espécies de peixe como fonte alternativa de proteases, único conjunto de enzimas capaz de hidrolisar a região helicoidal do colágeno. Além disso, tem reduzido os custos com curativos e pomadas de uso mais indicado no processo de cicatrização. **OBJETIVO:** Este trabalho objetivou revisar a importância da collagenase obtida a partir do pescado e sua aplicação no tratamento de cicatrização. **MÉTODOS:** Como procedimento metodológico adotado o presente trabalho baseou-se na análise de publicações encontradas nas bases de dados: SciELO e Google Acadêmico, através do uso dos termos: collagenase, collagenase pescado, collagenase cicatrização, collagenase cicatrização pescado. **RESULTADOS E DISCUSSÃO:** Uma possibilidade de técnica de separação das collagenases é através do emprego do sistema de duas fases aquosas, um método de purificação de proteínas em larga escala que possibilita separação seletiva. Enzimas collagenolíticas que apresentam elevada atividade e especificidade, são as preferidas para a produção desses peptídeos objetivando a aplicações industriais, com destaque para as áreas alimentícia e biomédica. Assim, recentemente, procedimentos de extração e isolamento de enzimas digestivas visando aplicação biotecnológica na formação de peptídeos bioativos de colágeno, vêm sendo testados. Estudos descreveram que as enzimas extraídas a partir da pele de espécies de peixes representam um passo significativo para avaliar o seu potencial nas aplicações biotecnológicas, principalmente pela necessidade de fontes alternativas para suprir a carência voltada para a área da saúde animal. Este processo pode ser associado com algum outro tipo de medicação e utilizados por um longo período de tempo sem que ocasione o risco de contaminar o ferimento e acelerar o tratamento de cicatrização. **CONCLUSÃO:** Os resíduos gerados a partir do processamento do pescado possuem grande potencial de enzimas collagenolíticas com capacidade de influenciar no tratamento de cicatrização, auxiliando no processo de regeneração tecidual, contribuindo como uma solução alternativa as pomadas empregadas atualmente no mercado e agregando valor ao produto pesqueiro.

Palavras-chave: curativos, peixes, proteases.

ANEXO D - PARTICIPAÇÃO EM APRESENTAÇÃO DE TRABALHO EM EVENTO CIENTÍFICO

5º Encontro Brasileiro Para Inovação Terapêutica
Recife, PE - 13 a 16 de dezembro de 2017.

ÁREA DE SUBMISSÃO:7- Biotecnologia e Nanotecnologia em saúde

EXTRAÇÃO DE PROTEASES PRODUZIDAS POR *Aspergillus* sp UCP 1279 UTILIZANDO SISTEMA DE DUAS FASES AQUOSAS

M. F. SILVA¹, O. S. SILVA , V. M. OLIVEIRA² , J. C. SILVA ³ , F.T.B. ROCHA² , S.R.S.
SILVA² , T. S. PORTO¹, M. N. CARNEIRO-DA-CUNHA²

1 Universidade Federal Rural de Pernambuco, Unidade Acadêmica de Garanhuns

2 Universidade Federal Rural de Pernambuco, Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal

3 Universidade Federal de Pernambuco, Centro de Biociências

4 Rede Nordeste de Biotecnologia (RENORBIO).

E-mail para contato: marcianieves@yahoo.com.br

RESUMO

Proteases são enzimas que catalisam reações hidrolíticas onde há a quebra das ligações peptídicas entre os aminoácidos das proteínas. O presente trabalho objetivou extrair proteases produzidas por *Aspergillus* sp UCP 1279 utilizando sistema de duas fases aquosas (SDFA). A produção de proteases foi realizada por fermentação submersa, utilizando o meio de cultivo MS-2 inoculado com uma solução de esporos para uma concentração final de 105 esporos/mL, as culturas foram mantidas em agitador orbital por 72h a 37°C. O líquido metabólico obtido foi utilizado para extração de proteases por SDFA. Durante o processo extração da enzima a influência das variáveis independentes: concentração do PEG, massa molar do PEG, concentração de citrato e pH foi avaliada através de um planejamento experimental completo 24. As variáveis-resposta analisadas foram o aumento de pureza, o coeficiente de partição e a recuperação da enzima. O ensaio que proporcionou melhor condição para a extração foi constituído por massa molar do PEG 8000 (g/mol), concentração do PEG a 20% (m/m), concentração de citrato de 20% (m/m) e pH 8,0. Foram obtidos coeficiente de partição de 19,24, aumento de pureza de 3,63 com uma recuperação de 196% na fase superior do sistema rica em PEG. Desta forma, o método utilizado para a extração de proteases produzidas por *Aspergillus* sp UCP 1279 demonstrou ser viável, podendo ser utilizado como uma primeira etapa em processos de purificação industrial.

ANEXO E - PARTICIPAÇÃO EM APRESENTAÇÃO DE TRABALHO EM EVENTO CIENTÍFICO

5º Encontro Brasileiro Para Inovação Terapêutica
Recife, PE - 13 a 16 de dezembro de 2017.

COLLAGEN OF PEACOCK BASS SKIN AS POTENTIAL SOURCE FOR THE PHARMACEUTICAL INDUSTRY IN THE PRODUCTION OF PEPTIDES

V. M. OLIVEIRA^{1,4}, J. C. SILVA², F. T. B. ROCHA¹, S. R. S. SILVA¹, Q. J. SILVA¹, M. N. CARNEIRO-DA-CUNHA¹, T. P. NASCIMENTO^{3,5}, M. N. C. CUNHA¹, R. S. BEZERRA⁴, A. L. F. PORTO^{1,5}

1 Universidade Federal Rural de Pernambuco, Departamento de Morfologia e Fisiologia

2 Universidade Federal de Pernambuco, Centro de Biociências

3 Universidade Federal de Pernambuco, Departamento de Ciências Farmacêuticas

4 Universidade Federal de Pernambuco, Laboratório de Enzimologia, Departamento de Bioquímica

5 Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami (LIKA), Universidade Federal de Pernambuco

E-mail: vagne_melo@hotmail.com

ABSTRACT

Collagen is a fibrous protein of high commercial value. Most of the isolates are from vertebrates, however, and have also been detected in marine invertebrates such as: jellyfish, squids, sea cucumbers, corals, sea anemones, among others. Type I collagen is the most abundant in freshwater and marine fish, being extracted from the skin, scales, fins, swimming bladder, bones, spine and fish muscles, and is widely used in the field of tissue engineering. Several steps are required for the isolation of collagen from aquatic sources. Thus, this present study aims to isolate the Pepsin-soluble collagen (PSC) from the peacock bass (*Cichla ocellaris*) skin, to determine its physicochemical properties and to obtain collagen hydrolysis. After the steps of skin separation, pre-treatment and collagen isolation, approximately 2.9% of total yield was obtained. Its structure was found to be composed of two different α chains ($\alpha 1$ and $\alpha 2$), dimmers and trimmers (β and γ chain, respectively). Moreover, PSC showed high absorption in the near UV spectrum (211 nm), indicating that the protein is type I collagen, and high solubility rates in different NaCl concentrations (from 0 to 3%) and acid pH media. Our results indicate the feasibility of obtaining PSC from *C. ocellaris* skin as well as its potential for applications in food and pharmaceutical products.

Keywords: collagen; skin; waste

ANEXO F - PARTICIPAÇÃO EM APRESENTAÇÃO DE TRABALHO EM EVENTO CIENTÍFICO

V Simpósio de Morfologia e Fisiologia Animal (V SIMFA)
Recife, PE - 24 a 26 de abril de 2018

Potencial Fibrinolítico De Resíduos Do Pescado

Vagne de Melo Oliveira¹, Sabrina Roberta Santana da Silva¹, Thiago Pajeú Nascimento¹,
Felype Thomas de Brito Rocha¹, Jessica Costa da Silva¹, Quesia Jemima da Silva¹, Ana Lúcia
Figueiredo Porto¹

¹Universidade Federal de Rural de Pernambuco, Laboratório de Tecnologia de Produtos
Bioativos,
Departamento de Morfologia e Fisiologia animal.
vagne_melo@hotmail.com

Resumo

Biomoléculas extraídas do processamento do pescado podem ser utilizadas no segmento industrial e farmacêutico após sucessivos processos de purificação. Assim, este trabalho objetivou determinar a atividade fibrinolítica de resíduos intestinais de resíduos do processamento do pescado (Foram utilizadas 16 espécies de peixes e 1 de camarão marinho, a saber: *Astronotus ocellatus*, *Anisotremus virginicus*, *Cichla ocellaris*, *Colossoma macropomum*, *Oreochromis niloticus*, *Lebranche mullet*, *Centropomus undecimalis*, *Sparisoma axillare*, *Eucinostomus gula*, *Rachycentron canadum*, *Caranx crysos*, *Lutjanus synagris*, *Scomberomorus mackerel*, *Parachromis managuensis*, *Pseudoplatystoma corruscans*, *Cynoscion leiarchus* e *Litopenaeus vannamei*) para atuarem como fonte alternativa para a indústria farmacêutica. Os resultados indicaram o hidrolisado de *L. vannamei* ($56,16 \pm 0,15$ U/mL) embora todos os demais extratos também apresentaram atividade com capacidade de serem melhor exploradas pela indústria através de novos bioprocessos, visando sua potencialidade no uso efeito de tratamento de doenças cardiovasculares.

Palavras chave: protease, biotecnologia, medicina, veterinária

ANEXO G - PARTICIPAÇÃO EM APRESENTAÇÃO DE TRABALHO EM EVENTO CIENTÍFICO

V Simpósio de Morfologia e Fisiologia Animal (V SIMFA)
Recife, PE - 24 a 26 de abril de 2018

Colágeno de Pele De Peixe: Isolamento, Bioquímica E Aplicações

Vagne de Melo Oliveira¹, Caio Rodrigo Dias Assis², Sabrina Roberta Santana da Silva¹, Felype Thomas de Brito Rocha¹, Jessica Costa da Silva¹, Quesia Jemima da Silva¹, Ranilson de Souza Bezerra², Ana Lúcia Figueiredo Porto¹

¹Universidade Federal de Rural de Pernambuco, Laboratório de Tecnologia de Produtos Bioativos,

Departamento de Morfologia e Fisiologia animal.

²Universidade Federal de Pernambuco. Centro de Biociências.
vagne_melo@hotmail.com

Resumo

Pele de peixes pode ser utilizada no tratamento de queimaduras e em processo de regeneração de órgãos. Dela é possível extrair o colágeno, uma proteína fibrosa de alto valor comercial. Assim, este trabalho objetivou isolar o colágeno da pele de *Cichla ocellaris* empregando pepsina comercial (PSC) e definir suas propriedades bioquímicas. A pele foi removida e tratada para o isolamento do colágeno, definido no SDS-PAGE. Uma cadeia compacta tripla helicoidal estabilizada por ligações de hidrogênio (analisadas por FTIR) caracterizou-a como tipo I. Além disso, o PSC mostrou alta absorção no espectro de ultravioleta (211nm), corroborando que a proteína é colágeno tipo I e também mostrou alta taxas de solubilidade em diferentes concentrações de NaCl (0 a 3%), bem como em meio de pH ácido. Nossos resultados indicam a viabilidade de uso do colágeno PSC de *C. ocellaris*, bem como o seu potencial para aplicações biotecnológicas, como na indústria biomédica.

ANEXO H - PARTICIPAÇÃO EM APRESENTAÇÃO DE TRABALHO EM EVENTO CIENTÍFICO

V Simpósio de Morfologia e Fisiologia Animal (V SIMFA)
Recife, PE - 24 a 26 de abril de 2018

Extração de collagenases de peixes e sua potencial aplicação na remodelação tecidual: atividade prática de estágio docência em bioquímica

Jessica Costa da Silva¹, Steliane Lima Santos², Felype Thomas de Brito Rocha², QuesiaJemima da Silva², Sabrina Roberta Santana da Silva², Ana Lúcia Figueiredo Porto², Maria Taciana Holanda Cavalcanti², Vagne de Melo Oliveira²

¹Universidade Federal de Pernambuco, Centro de Biociências.

²Universidade Federal de Rural de Pernambuco, Laboratório de Tecnologia de Produtos Bioativos, Departamento de Morfologia e Fisiologia animal.

jess.cost15@gmail.com

Resumo

Colagenases são proteases que fazem parte de um grupo de enzimas de importância vital, sobretudo, do ponto de vista fisiológico, atuando na manutenção e regeneração de órgãos e tecidos. O objetivo deste trabalho foi extrair colagenase de 6 espécies de peixes durante a aula prática de bioquímica do curso de engenharia de pesca/UFRPE e descrever sua potencialidade para aplicação na reparação tecidual. Para tanto, foram utilizadas vísceras intestinais das espécies *Caranx bartholomaei*, *Trachinotus carolinus*, *Astronotus ocellatus*, *Colossoma macropomum*, *Oreochromis niloticus* e *Sarotherodon*. Os resíduos sólidos foram processados no Laboratório de Tecnologia de Produtos Bioativos, local de preparação do extrato bruto e dosagens enzimáticas. Dentre as espécies citadas acima, a *Astronotus ocellatus* foi a que apresentou maior atividade ($200 \pm 0,01$ U/mg), sugerindo a potencialidade da espécie para aplicações no segmento médico após sucessivas etapas de purificação para obtenção da enzima livre de interferentes, seguindo protocolo comercial.

Palavras chave: biotecnologia, colágeno, enzima, regeneração

ANEXO I - PARTICIPAÇÃO EM APRESENTAÇÃO DE TRABALHO EM EVENTO CIENTÍFICO

V Simpósio de Morfologia e Fisiologia Animal (V SIMFA)
Recife, PE - 24 a 26 de abril de 2018

Bioquímica do Colágeno e Sua Utilização pela Indústria de Alimentos – Uma Breve Revisão

Jessica Costa da Silva¹, Quesia Jemima da Silva², Felype Thomas de Brito Rocha², Sabrina Roberta Santana da Silva², Vagne de Melo Oliveira², Ana Lúcia Figueiredo Porto²

¹Universidade Federal de Pernambuco, Centro de Biociências.

²Universidade Federal de Rural de Pernambuco, Laboratório de Tecnologia de Produtos Bioativos, Departamento de Morfologia e Fisiologia animal.

jess.cost15@gmail.com

Resumo

O colágeno é uma proteína de origem animal, cuja função no organismo é contribuir com a integridade estrutural dos tecidos em que está presente. Esta proteína é encontrada nos tecidos conjuntivos do corpo, tais como os ossos, tendões, cartilagens, veias, pele, dentes, bem como nos músculos e na camada córnea dos olhos. Em termos de quantidade, é o composto mais importante do tecido conjuntivo e é um elemento estrutural importante em organismos multicelulares. Devido a sua abundância, principalmente na composição de resíduos de animais, como peles, carcaças, entre outros, essa substância tem sido isolada e utilizada pela indústria de alimentos, no intuito de enriquecer nutricionalmente o produto, assim como também baratear os custos de produção, devido à utilização quase total do animal. Desta forma, este trabalho objetivou realizar uma breve revisão sobre a bioquímica do colágeno e sua aplicação na indústria de alimentos.

Palavras chave: alimento funcional, colágeno, proteínas.

ANEXO J - PARTICIPAÇÃO EM APRESENTAÇÃO DE TRABALHO EM EVENTO CIENTÍFICO

Congresso Brasileiro de Resíduos Sólidos Recife - PE, 4 a 6 de setembro de 2018

USO DE RESÍDUOS ORGÂNICOS DE ANCHOVA E ROBALO-FLECHA PARA RECUPERAÇÃO DE PROTEASES ALCALINAS

SILVA, Jéssica Costa Mestranda. Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas da Universidade Federal Rural de Pernambuco (PPGCB/UFPE)

jess.cost15@gmail.com

SILVA, Quesia Jemima. Doutoranda Programa de Pós-graduação em Biociência Animal da Universidade Federal Rural de Pernambuco (LABTECBIO/UFRPE)

quesiajemima0@gmail.com

OLIVEIRA, Vagne de Melo. Pós-doutorando – PNPd CAPES/FACEPE

Programa de Pós-graduação em Biociência Animal da Universidade Federal Rural de Pernambuco (PPGBA/UFRPE)

vagne_melo@hotmail.com

PORTO, Ana Lúcia Figueiredo

Professora Titular

Laboratório de Tecnologia de Produtos Bioativos da Universidade Federal Rural de Pernambuco (LABTECBIO/UFRPE)

analuporto@yahoo.com.br

RESUMO

Proteases alcalinas extraídas de intestino de espécies de peixes são amplamente desejadas pela indústria para aplicações nos segmentos alimentícios, farmacêuticos e biomédico. Recuperar resíduos do pescado fornece uma fonte alternativa dessas biomoléculas. Desse modo, este trabalho objetivou recuperar atividade enzimática de proteases alcalinas (colagenase, tripsina e quimotripsina) a partir de resíduos intestinais de robalo *Centropomus undecimalis* e de anchova *Pomatomus saltatrix*, como forma de reduzir o impacto ambiental causado pelos despejos inadequados e fornecer uma fonte alternativa de proteases alcalinas para a indústria. Foi detectado melhor atividade volumétrica e específica da enzima colagenolítica na segunda etapa de extração, para as ambas as espécies (C. undecimalis: $170,0 \pm 0,00$ U.mL⁻¹ e $102,41 \pm 0,00$ U.mg⁻¹; P. saltatrix: $139,0 \pm 0,03$ U.mL⁻¹ e uma específica de $82,24 \pm 0,02$ U.mg⁻¹). Ainda, a espécie de C. undecimalis apresentou nesta etapa melhor atividade específica para tripsina ($0,80 \pm 0,11$ U.mg⁻¹) e quimotripsina ($0,50 \pm 0,23$ U.mg⁻¹). Assim, os resultados sugerem possibilidade de reutilização dos resíduos orgânicos intestinais das espécies descritas com potencial para fornecimento de proteases alcalinas, seja para o segmento biomédico (colagenase), detergentes (tripsina) e/ou alimentos (quimotripsina), após processos tecnológicos adequados para cada aplicação.

PALAVRAS-CHAVE: proteases, pescado, resíduos.

ANEXO K - PARTICIPAÇÃO EM APRESENTAÇÃO DE TRABALHO EM EVENTO CIENTÍFICO

Congresso Brasileiro de Resíduos Sólidos Recife - PE, 4 a 6 de setembro de 2018

EXTRAÇÃO DE BIOMOLÉCULAS DE INTERESSE BIOTECNOLÓGICO DE RESÍDUOS DO BENEFICIAMENTO DO PESCADO DE PETROLÂNDIA-PE

OLIVEIRA, Vagne de Melo. Pós-doutorando – PNPd CAPES/FACEPE

Programa de Pós-graduação em Biociência Animal da Universidade Federal Rural de Pernambuco (PPGBA/UFRPE)

vagne_melo@hotmail.com

SILVA, Jéssica Costa. Mestranda

Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas da Universidade Federal Rural de Pernambuco (PPGCB/UFRPE)

jess.cost15@gmail.com

SILVA, Quesia Jemima. Doutoranda Programa de Pós-graduação em Biociência Animal da Universidade Federal Rural de Pernambuco (LABTECBIO/UFRPE)

quesiajemima0@gmail.com

PORTO, Ana Lúcia Figueiredo Professora Titular

Laboratório de Tecnologia de Produtos Bioativos da Universidade Federal Rural de Pernambuco (LABTECBIO/UFRPE)

analuporto@yahoo.com.br

RESUMO

Cabeça, cauda, barbatanas, ossos, pele, estômago, intestino, cecos, mesentério e até coração são consideradas partes não comestíveis, ou de pouco interesse do consumidor. Assim, acabam sendo descartados. A indústria acaba não investindo no reaproveitamento desses resíduos sólidos muito devido a elevação dos custos que isso traria. Todavia, esses resíduos são fontes de biomoléculas proteicas, especialmente com função enzimática. Com isso, este trabalho objetivou investigar o potencial enzimático recuperado de resíduos sólidos (intestino, fígado, coração, estômago e resquícios de músculo) e extrair colágeno da pele tucunaré *Cichla ocellaris* para produzir peptídeos por hidrólise. Todos os resíduos internos apresentaram potencial no fornecimento de proteases alcalinas, exceto o estômago. O coração apresentou melhor desempenho com o substrato BApNA (21,53 U.mg⁻¹) e Suc-Phe-p-Nan (21,53 U.mg⁻¹), indicando a presença de tripsina e quimotripsina, respectivamente. A atividade collagenolítica mais significativa foi detectada no intestino (94,35 U.mg⁻¹). Da pele, foi extraído o colágeno (rendimento de 2,9). A produção de peptídeos se deu por hidrólise após 24 horas em contato com a enzima collagenolítico biotecnológico para cada uma, agregando valor ao produto da pesca e reduzindo o impacto ambiental ocasionado pelos despejos inadequados.

PALAVRAS-CHAVE: colágeno, enzimas, resíduos.

ANEXO L - PARTICIPAÇÃO EM APRESENTAÇÃO DE TRABALHO EM EVENTO CIENTÍFICO

Congresso Brasileiro de Resíduos Sólidos Recife - PE, 4 a 6 de setembro de 2018

USO DE RESÍDUOS SÓLIDOS DE ESPÉCIES DE PEIXES NAS AULAS PRÁTICAS DE BIOQUÍMICA

OLIVEIRA, Vagne de Melo- Pós-doutorando – PNPd CAPES/FACEPE

Programa de Pós-graduação em Biociência Animal da Universidade Federal Rural de Pernambuco (PPGBA/UFRPE)

vagne_melo@hotmail.com

SILVA, Jéssica Costa - Mestranda Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas da Universidade Federal Rural de Pernambuco (PPGCB/UFPE)

jess.cost15@gmail.com

SILVA, Quesia Jemima - Doutoranda Programa de Pós-graduação em Biociência Animal da Universidade Federal Rural de Pernambuco (LABTECBIO/UFRPE)

quesiajemima0@gmail.com

PORTO, Ana Lúcia Figueiredo - Professora Titular

Laboratório de Tecnologia de Produtos Bioativos da Universidade Federal Rural de Pernambuco (LABTECBIO/UFRPE)

analuporto@yahoo.com.br

RESUMO

É reportado certo grau de dificuldade dos alunos provenientes de cursos das ciências agrárias de associar o conteúdo ministrado na disciplina de bioquímica à vida profissional. Uma das formas de diminuir essas dificuldades é através de práticas alternativas utilizando elementos do cotidiano da vida profissional dos discentes, como no caso da reutilização dos resíduos orgânicos do pescado. Partindo do pressuposto que os alunos do curso de engenharia de pesca lidam com questões relacionadas a produção de resíduos do beneficiamento, este trabalho objetivou aproximar teoria e prática profissional ao reutilizar resíduos intestinais de espécies de peixes neotropicais para desenvolvimento dos conteúdos “Proteínas” e “Enzimas”. Após processos de maceração, homogeneização e centrifugação, os extratos brutos foram preparados para dosagens de proteínas e determinação da atividade enzimática. Foi observado durante as práticas, maior atividade proteica, atividade de tripsina e fibrinolítica em resíduos das espécies *Haemulon plumieri* ($13,51 \pm 0,34$ U.mg⁻¹), *Anisotremus virginicus* ($1,20 \pm 0,01$ U.mg⁻¹) e $39,35 \pm 0,01$ U.mL⁻¹ (*Sarotherodon niloticus*), respectivamente. Com as aulas práticas, foi possível interagir de forma interdisciplinar, discutir questões ambientais de tratamento dos resíduos sólidos da indústria da pesca e aproximar o conteúdo teórico a prática profissional dos futuros engenheiros de pesca.

PALAVRAS-CHAVE: aprendizagem, pesca, resíduos

ANEXO M - PARTICIPAÇÃO EM APRESENTAÇÃO DE TRABALHO EM EVENTO CIENTÍFICO

Congresso Brasileiro de Resíduos Sólidos Recife - PE, 4 a 6 de setembro de 2018

ESTUDO DA INFLUÊNCIA DA TEMPERATURA NA ATIVIDADE ENZIMÁTICA RECUPERADA DE RESÍDUOS SÓLIDOS DO BENEFICIAMENTO DO PESCADO EM MACEIÓ – AL

SILVA, Quesia Jemima. Doutoranda Programa de Pós-graduação em Biociência Animal da Universidade Federal Rural de Pernambuco (LABTECBIO/UFRPE)

quesiajemima0@gmail.com

SILVA, Jéssica Costa. Mestranda - Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas da Universidade Federal Rural de Pernambuco (PPGCB/UFPE)

jess.cost15@gmail.com

OLIVEIRA, Vagne de Melo - Pós-doutorando – PNPd CAPES/FACEPE

Programa de Pós-graduação em Biociência Animal da Universidade Federal Rural de Pernambuco (PPGBA/UFRPE)

vagne_melo@hotmail.com

PORTO, Ana Lúcia Figueiredo - Professora Titular

Laboratório de Tecnologia de Produtos Bioativos da Universidade Federal Rural de Pernambuco (LABTECBIO/UFRPE)

analuporto@yahoo.com.br

RESUMO

É reportado certo grau de dificuldade dos alunos provenientes de cursos das ciências agrárias de associar o conteúdo ministrado na disciplina de bioquímica à vida profissional. Uma das formas de diminuir essas dificuldades é através de práticas alternativas utilizando elementos do cotidiano da vida profissional dos discentes, como no caso da reutilização dos resíduos orgânicos do pescado. Partindo do pressuposto que os alunos do curso de engenharia de pesca de peixes neotropicais para desenvolvimento dos conteúdos “Proteínas” e “Enzimas”. Após processos de maceração, homogeneização e centrifugação, os extratos brutos foram preparados para dosagens de proteínas e determinação da atividade enzimática. Foi observado durante as práticas, maior atividade proteica, atividade de tripsina e fibrinolítica em resíduos das espécies *Haemulon plumieri* ($13,51 \pm 0,34$ U.mg⁻¹), *Anisotremus virginicus* ($1,20 \pm 0,01$ U.mg⁻¹) e $39,35 \pm 0,01$ U.mL⁻¹ (*Sarotherodon niloticus*), respectivamente. Com as aulas práticas, foi possível interagir de forma interdisciplinar, discutir questões ambientais de tratamento dos resíduos sólidos da indústria da pesca e aproximar o conteúdo teórico a prática profissional dos futuros engenheiros de pesca.

PALAVRAS-CHAVE: aprendizagem, pesca, resíduos.

ANEXO N – MENÇÃO HONROSA

Congresso Brasileiro de Resíduos Sólidos
Recife - PE, 4 a 6 de setembro de 2018

VII ENCONTRO PERNAMBUCANO DE RESÍDUOS SÓLIDOS V CONGRESSO BRASILEIRO DE RESÍDUOS SÓLIDOS

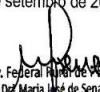
Recife, 4 a 6 de setembro de 2018



CERTIFICADO

Certificamos que o artigo intitulado "EXTRAÇÃO DE BIOMOLÉCULAS DE INTERESSE BIOTECNOLÓGICO DE RESÍDUOS DO BENEFICIAMENTO DO PESCADO DE PETROLÂNDIA-PE", de autoria de OLIVEIRA, Vagne de Melo; SILVA, Jéssica Costa; SILVA, Quesia Jemima e PORTO, Ana Lúcia Figueiredo, recebeu premiação de **Menção Honrosa** no VII Encontro Pernambucano de Resíduos Sólidos e V Congresso Brasileiro de Resíduos Sólidos, promovido no período de 4 a 6 de setembro de 2018, pela Universidade Federal Rural de Pernambuco - UFRPE.

Recife, 6 de setembro de 2018


Univ. Federal Rural de PE
Prof. Dr. Maria José de Sena
Reitora

Apoio:



Realização:



ANEXO O - MENÇÃO HONROSA

Congresso Brasileiro de Resíduos Sólidos
Recife - PE, 4 a 6 de setembro de 2018

VII ENCONTRO PERNAMBUCANO DE RESÍDUOS SÓLIDOS V CONGRESSO BRASILEIRO DE RESÍDUOS SÓLIDOS

Recife, 4 a 6 de setembro de 2018



CERTIFICADO

Certificamos que o artigo intitulado "USO DE RESÍDUOS ORGÂNICOS DE ANCHOVA (*Pomatomus saltatrix*) E ROBALO-FLECHA (*Centropomus undecimalis*) PARA RECUPERAÇÃO DE PROTEASES ALCALINAS", de autoria de SILVA, Jéssica Costa; SILVA, Quesia Jemima; OLIVEIRA, Vagne de Melo e PORTO, Ana Lúcia Figueiredo, recebeu premiação de **Menção Honrosa** no VII Encontro Pernambucano de Resíduos Sólidos e V Congresso Brasileiro de Resíduos Sólidos, promovido no período de 4 a 6 de setembro de 2018, pela Universidade Federal Rural de Pernambuco - UFRPE.

Recife, 6 de setembro de 2018


Univ. Federal Rural de PE
Prof. Dr. Maria José de Sena
Reitora
UFRPE

Apoio:



Realização:



ANEXO P – PARTICIPAÇÃO EM ARTIGO/COAUTORIA



BOLETIM DO INSTITUTO DE PESCA

ISSN 1678-2305 online version

Scientific Article



RECOVERY OF FIBRINOLYTIC AND COLLAGENOLYTIC ENZYMES FROM FISH AND SHRIMP BYPRODUCTS: POTENTIAL SOURCE FOR BIOMEDICAL APPLICATIONS

Vagne de Melo Oliveira^{1,2}Caio Rodrigo Dias Assis²Jéssica Costa Silva¹Quesia Jemima Silva¹Ranilson de Souza Bezerra²Ana Lúcia Figueiredo Porto¹

¹Universidade Federal Rural de Pernambuco – UFRPE, Laboratório de Tecnologia de Produtos Bioativos – LABTECBIO, Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal – DMFA, Av. Dom Manoel de Medeiros, s/n, CEP 52171-900, Recife, PE, Brasil. E-mail: vagne_melo@hotmail.com (corresponding author).

²Universidade Federal de Pernambuco – UFPE, Laboratório de Enzimologia – LABENZ, Departamento de Bioquímica, Campus Universitário, s/n, CEP 50670-901, Recife, PE, Brasil.

ABSTRACT

Fish and shrimp industries generate a significant amount of by-products. These by-products can be used for the extraction of enzymes of biomedical interest, such as fibrinolytic and collagenolytic. Thus, this work aimed to perform a screening of fish and shrimp byproducts as sources of enzymes with fibrinolytic and collagenolytic activities and to characterize the biochemical properties of crude extracts with collagenolytic activity from *Cichla ocellaris* residues. Fibrinolytic enzymes were recovered with activities between $5.51 \pm 0.02 \text{ U.mL}^{-1}$ (*Caranx crysos*) and $56.16 \pm 0.42 \text{ U.mL}^{-1}$ (*Litopenaeus vannamei*), while collagenolytic enzymes were detected in a range between $6.79 \pm 0.00 \text{ U.mg}^{-1}$ (*Trachurus lathami*) and $94.35 \pm 0.02 \text{ U.mg}^{-1}$ (*C. ocellaris*). After collagenolytic screening, the selected species was *C. ocellaris*, being subjected to a preheating, which culminated with an increase of enzymatic activity of 35.07% (up to $127.44 \pm 0.09 \text{ U.mg}^{-1}$). The optimal collagenolytic activity recovered from *C. ocellaris* byproducts was 55°C (thermostable between 25 and 60°C) and 7.5 (stable between 6.5 and 11.5) for temperature and pH evaluations, respectively. The kinetic parameters were determined, obtaining K_m of 5.92 mM and V_{max} of 294.40 U.mg^{-1} . The recovered enzyme was sensitive to the Cu^{2+} , Hg^{2+} and Pb^{2+} ions, being partially inhibited by phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF), N-p-tosyl-L-lysine chloromethyl ketone (TLCK) and Benzamidine. Furthermore, it was able to cleave native type I collagen, the most important type for industry. Thus, the recovery of biomolecules, besides offering to the industry an alternative source of active molecules, contributes to the reduction of the environmental impact, adding value to the fish product and providing a new source of income.

Key words: byproducts; collagenase; thrombolytic; byproducts.

RECUPERAÇÃO DE ENZIMAS FIBRINOLÍTICAS E COLAGENOLÍTICAS DE RESÍDUOS DE PEIXES E CAMARÕES: FONTE POTENCIAL PARA APLICAÇÕES BIOMÉDICAS

RESUMO