

**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO
DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA
BACHARELADO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS**

BEATRIZ DE AQUINO MARQUES DA COSTA

**RECUPERAÇÃO E PURIFICAÇÃO PARCIAL DE PROTEASES
COLAGENOLÍTICAS DE TAINHA (*Mugil liza*) USANDO PRECIPITAÇÃO E
PARTICIONAMENTO EM SISTEMAS DE FASES**

RECIFE, 2020

BEATRIZ DE AQUINO MARQUES DA COSTA

**RECUPERAÇÃO E PURIFICAÇÃO PARCIAL DE PROTEASES
COLAGENOLÍTICAS DE TAINHA (*Mugil liza*) USANDO PRECIPITAÇÃO E
PARTICIONAMENTO EM SISTEMAS DE FASES**

Monografia apresentada como trabalho de conclusão de curso como parte dos requisitos para obtenção do título de Bacharel em Ciências Biológicas.

Orientadora: Prof. Dr. Ana Lúcia Figueiredo Porto

RECIFE, 2020

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal Rural de Pernambuco
Sistema Integrado de Bibliotecas
Gerada automaticamente, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

- C837r Costa, Beatriz de Aquino Marques da
RECUPERAÇÃO E PURIFICAÇÃO PARCIAL DE PROTEASES COLAGENOLÍTICAS DE TAINHA
(Mugil liza) USANDO PRECIPITAÇÃO E PARTICIONAMENTO EM SISTEMA DE FASES / Beatriz de Aquino
Marques da Costa. - 2020.
39 f. : il.
- Orientadora: Ana Lucia Figueiredo Porto.
Inclui referências.
- Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação) - Universidade Federal Rural de Pernambuco,
Bacharelado em Ciências Biológicas, Recife, 2022.
1. Resíduos do pescado. 2. Proteases colagenolíticas. 3. Métodos de purificação. I. Porto, Ana Lucia
Figueiredo, orient. II. Título

CDD 574

BEATRIZ DE AQUINO MARQUES DA COSTA

**RECUPERAÇÃO E PURIFICAÇÃO PARCIAL DE PROTEASES
COLAGENOLÍTICAS DE TAINHA (*Mugil liza*) USANDO PRECIPITAÇÃO
EPARTICIONAMENTO EM SISTEMA DE FASES**

**Trabalho de conclusão de curso defendido e aprovado pela
banca examinadora**

Data da aprovação: 03 de fevereiro de 2020

Profa. Dra. Ana Lúcia Figueiredo Porto – Presidente/Orientadora
Universidade Federal Rural de Pernambuco – UFRPE

Dra. Márcia Nieves Carneiro da Cunha
Universidade Federal Rural de Pernambuco – UFRPE

Dr. Vagne de Melo Oliveira
Universidade Federal Rural de Pernambuco – UFRPE

RESUMO

As proteases desempenham um papel importante no campo dos estudos de biotecnologia, razão pela qual a pesquisa por fontes alternativas é altamente desejável. Assim, aliar técnicas de extração, recuperação e purificação a fontes alternativas, como subprodutos da cadeia produtiva da pesca, a fim de gerar o menor dano possível ao meio aquático é rentável para o mercado global de enzimas. Portanto, o objetivo do presente trabalho é recuperar parcialmente e purificar proteases colagenolíticas de vísceras digestivas de Tainha (*Mugil liza*) com potencial aplicação biotecnológica. Para isso, o extrato de vísceras digestivas (intestino, fígado e uma mistura de várias vísceras) foi precipitado utilizando sulfato de amônio. Além disso, as vísceras intestinais foram submetidas à partição por um Sistema Aquoso de Duas Fases (SDFA) e um Sistema de Partição Trifásica (TPP), a fim de avaliar as condições mais benéficas para a purificação de proteases colagenolíticas. Os resultados obtidos demonstram que, para precipitação com sulfato de amônio, os melhores resultados do Fator de Purificação ocorreram nas concentrações de 30-60% para todos os extratos avaliados (intestino, fígado e mix); o sistema bifásico aquoso (PEG/Citrato) realizado com extrato de vísceras intestinais de tainha demonstra que as condições: PEG de 8000 g/mol de massa molar; concentração de 20% de PEG; A concentração de 15% de citrato leva ao fator de purificação mais alto. Observa-se também que as colagenases tendem a migrar para a fase rica em PEG; para o sistema trifásico a maior taxa de recuperação da protease colagenolítica foi observada na proporção de 1:0,5, obtendo recuperação de 240,01% e fator de purificação de 2,55. Assim, conclui-se que os ensaios podem ser utilizados na recuperação de biomoléculas de resíduos sólidos orgânicos negligenciados da indústria pesqueira.

Palavras-chave: Resíduos do pescado, Proteases colagenolíticas, Técnicas de purificação.

ABSTRACT

Proteases play an important role in the field of biotechnology studies, which is why the research for alternative sources is highly desirable. Thus, combining extraction, recovery and purification techniques to alternative sources, such as by-products of the fishery production chain, in order to generate the least possible damage to the aquatic environment is profitable for the global enzyme market. Therefore, the objective of the present work is to partially recover and purify collagenolytic proteases from Mullet (*Mugil liza*) digestive viscera with potential biotechnological application. For this, the digestive viscera extract (intestine, liver and a mixture of various viscera) was precipitated using ammonium sulfate ($(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$). In addition, the intestinal viscera were submitted to partitioning by an Aqueous Two-Phase System (ATPS) and a Three-Phase Partitioning system (TPP), to evaluate the most beneficial conditions for the purification of collagenolytic proteases. The results obtained demonstrate that, for ammonium sulphate precipitation, the best results of Purification Factor occurred in concentrations of 30-60% for all assessed extracts (intestine, liver and mix); the aqueous two-phase system (PEG/Citrate) carried out with Mullet intestinal viscera extract demonstrates that the conditions: PEG of 8000 g/mol molar mass; 20% concentration of PEG; 15% citrate concentration lead to the highest purification factor. It is also observed that the collagenases tend to migrate to the PEG-rich phase; for the three-phase system (t-butanol / $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$) the highest recovery rate of collagenolytic protease was observed in the proportion of 1:0.5, obtaining recovery of 240.01% and a purification factor of 2,55. Thus, it is concluded that the tests can be used in the recovery of biomolecules from neglected organic solid waste from the fishing industry.

Keywords: Fish waste, Collagenolytic proteases, Purification techniques.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	7
2. REVISÃO DE LITERATURA	9
2.1 Resíduos do pescado.....	9
2.2 Proteases Colagenolíticas	10
2.3 Técnicas de separação de biomoléculas.....	12
2.3.1 <i>Precipitação</i>	<i>14</i>
2.3.2 <i>Purificação por particionamento</i>	<i>16</i>
3. OBJETIVOS.....	21
3.1 Objetivo Geral	21
3.2 Objetivos Específicos	21
4. MATERIAIS E MÉTODOS	22
4.1. Obtenção do material biológico	22
4.2 Extração de proteases colagenolíticas	22
4.3 Etapas de separação.....	22
4.3.1 <i>Precipitação salina.....</i>	<i>22</i>
4.3.2 <i>Sistema de duas fases aquosas (SDFA)</i>	<i>23</i>
4.3.3 <i>Particionamento trifásico.....</i>	<i>25</i>
4.4 Determinações analíticas	25
4.4.1 <i>Determinação de proteínas totais.....</i>	<i>25</i>
4.4.2 <i>Atividade colagenolítica</i>	<i>25</i>
4.4.3 <i>Atividade proteolítica total.....</i>	<i>25</i>
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	27
5.1 Aplicação da técnica de precipitação.....	27
5.2 Aplicação do sistema de duas fases aquosas (SDFA)	30
5.3 Aplicação so sistema trifásico (TPP).....	33
6. CONSIDERAÇÕES FINAIS	35
7. REFERÊNCIAS.....	36

1. INTRODUÇÃO

O avanço das investigações no campo da biotecnologia tem como consequência o desenvolvimento de estratégias cada vez mais eficientes para a extração, recuperação, produção e purificação de biomoléculas de diferentes fontes, permitindo sua produção em larga escala e utilização por diversos segmentos industriais. Usualmente, em laboratório, para que se obtenha o grau de purificação desejado, são utilizados métodos que envolvem uma sequência de etapas, o que pode ser contraproducente para a aplicação industrial, visto que a realização de múltiplas etapas complexas demandaria o emprego de equipamentos para cada operação, elevando o custo de produção, mão-de-obra e o tempo necessário para conclusão do processo. Dentro dessa perspectiva, são habitualmente empregados os métodos cromatográficos, tais como exclusão molecular, afinidade, troca iônica, HPLC, entre outros (PESSOA JÚNIOR, 2005; COSTA-JUNIOR et al., 2019).

Quando se trata de empregar um método de purificação para uma biomolécula, a escolha leva em consideração desde o tempo necessário até o tipo de matéria-prima utilizada. A busca por métodos alternativos (tais como: precipitação salina, precipitação em solventes orgânicos, filtração, ultrafiltração, centrifugação, ultracentrifugação, particionamento bifásico e trifásico, por exemplo) é altamente incentivada, principalmente por reduzir os custos com reagentes. O aprimoramento e desenvolvimento dessas técnicas menos complexas tendem a facilitar sua utilização, tornado sua aplicação em larga escala economicamente viável (PESSOA JÚNIOR, 2005; SANKARAN et al., 2019; MAZZOLA et al., 2008).

Além do tipo de técnica a ser empregada, o processo de obtenção de uma biomolécula pode ser barateado pelo uso de fontes alternativas de matéria-prima, como subprodutos agroindustriais, como de resíduos do beneficiamento da pesca e aquicultura (cabeça, cauda, barbatana, ossos, escamas, pele, bexiga natatória e vísceras internas em geral; cabeças de camarão, resíduos da ostreicultura, entre outros). Esse material é muitas vezes descartado de forma inadequada, levando à danos ao meio ambiente, e representa uma fonte potencial, abundante e acessível para extração de inúmeras moléculas biologicamente ativas, principalmente de proteínas de interesse comercial, utilizadas desde tratamento de feridas e queimaduras até para o amaciamento de carnes e produtos derivados (KUMAR et al., 2019; AISSAOUI et al., 2016; LIMA, 2013; OLIVEIRA et al., 2017).

Dentre as proteínas, merecem destaque um grupo de enzimas de alto valor econômico, proteases (pepsina, tripsina, quimotripsina, collagenase, por exemplo) (OLIVEIRA et al., 2017). Proteases representam uma fatia importante no campo de estudos da biotecnologia, motivo pelo qual sua investigação a partir de fontes alternativas é altamente desejável. Assim, atrelar a técnica de extração a fonte alternativa pesqueira de forma a gerar o mínimo de dano possível ao ambiente aquático, e que diretamente seja rentável para o mercado global de enzimas, é um desafio a ser enfrentado, o que indubitavelmente agrega valor ao mercado da pesca e torna a prática de obtenção de proteases de fontes aquáticas ecologicamente benigna.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Resíduos do pescado

Segundo a Organização das Nações Unidas para Agricultura e Pesca (FAO), até 2030 espera-se uma alta considerável na produção e consumo de pescado em todas as regiões do mundo, sendo de 37% na África, 20% na Ásia e 28% na Oceania. Na América Latina, especificamente, o aumento projetado pela organização é de 33%, o que é benéfico para a região que tem porções de sua população dedicadas exclusivamente a atividade pesqueira. Além de peixes marinhos, a FAO também chama a atenção para a captura de peixes de água doce, que compreendem aproximadamente 20% do pescado produzido na América Latina e que cujo consumo chega a cerca de 150kg *per capita* ao ano na região Amazônica (FAO, 2018).

De todo o pescado produzido, cerca de 16,54% representa o que é realmente destinado ao consumo após o processamento (NAZZARO et al., 2018), enquanto os subprodutos são muitas vezes negligenciados, resultando no desperdício de uma matéria-prima rica, além disso, o acúmulo e falta do tratamento adequado e reaproveitamento desses resíduos apresenta um alto potencial de causar sérios problemas ambientais, com influência sobre as cadeias tróficas aquáticas. Esses resíduos resultantes do tratamento do pescado (ossos, pele, cabeça, escamas e vísceras) podem ser reaproveitados e empregados em processos biotecnológicos que resultam na sua valorização e recuperação de produtos, como a obtenção de biomoléculas.

Ao reconhecer o potencial dos resíduos provenientes da cadeia de produção pesqueira, pesquisadores e o setor industrial buscam desenvolver cada vez mais meios para converter esses subprodutos em fontes de biomoléculas de alto valor agregado. Assim, os subprodutos do processamento do pescado representam uma fonte potencial de recursos, de onde podem ser recuperadas biomoléculas relevantes tecnológica, nutricional e economicamente relevantes, como enzimas (proteases, principalmente), colágeno (OLIVEIRA et al., 2019), minerais, peptídeos bioativos e pigmentos (NAZZARO et al., 2018).

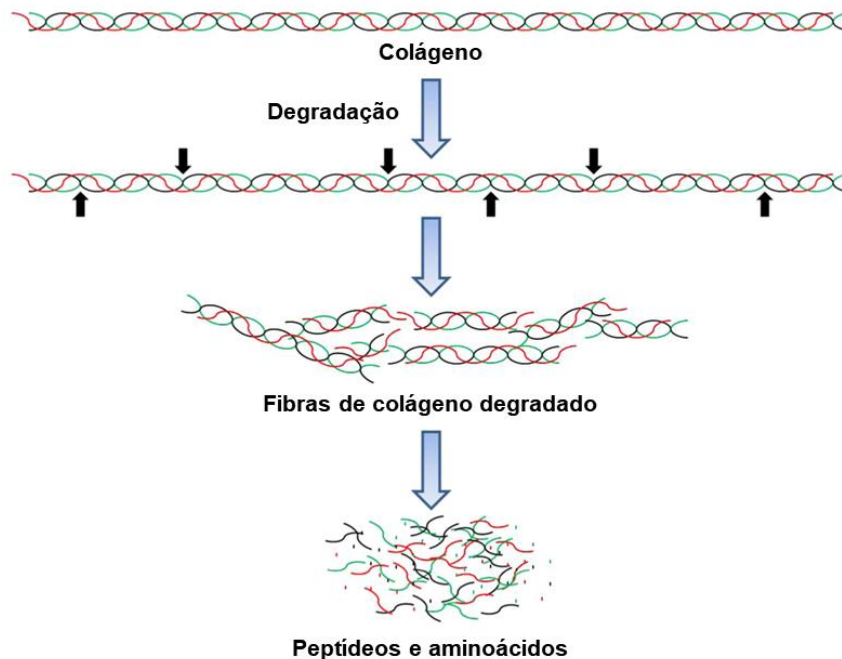
Dentre os resíduos gerados durante o processamento do pescado, destacam-se os órgãos/vísceras internos (intestino, estômago, fígado, entre outros) dos animais capturados, que podem corresponder a 5-10% do peso total, tendendo a aumentar quanto maior for a massa corporal do peixe. Das vísceras é possível recuperar

diferentes tipos de enzimas, de acordo com o hábito da espécie capturada. As principais proteases presentes nas vísceras dos peixes são as aspartato proteases, como a pepsina, e as serinoproteases, como as proteases com atividade colagenolítica. Isso aumenta a relevância desses resíduos, pois as proteases são as enzimas mais estudadas para aplicação em bioprocessos industriais (KETNAWA et al., 2014).

2.2 Proteases Colagenolíticas

Proteases são enzimas capazes de clivar as ligações peptídicas da estrutura proteica e assim converte-la em estruturas menores, como peptídeos e aminoácidos. Dentre essas, as serinoproteases participam de processos como digestão, formação da resposta imunológica e coagulação sanguínea e, independente do organismo de origem, as enzimas encontradas apresentam semelhanças quanto a sua estrutura e mecanismos de hidrólise da estrutura proteica. Compondo esse grupo, há um conjunto de enzimas capazes de catalisar a hidrólise da tripla hélice da estrutura do colágeno, as chamadas proteases colagenolíticas (Figura 1). A principal diferença entre as proteases colagenolíticas e as “verdadeiras colagenases” está na estrutura de seus centros ativos, sendo as colagenases verdadeiras classificadas como metaloproteases, além disso, as primeiras são capazes de hidrolisar uma maior variedade de substratos que não são específicos para as colagenases (BHAGWAT & DANDGE, 2018; SAKHAROV *et al.*, 1994).

Figura 1. Degradação da molécula do colágeno pela collagenase.



Fonte: Adaptado de Bhagwat & Dandge (2018)

As proteases colagenolíticas podem ser obtidas a partir de diversas fontes, tanto procariontes como eucariontes. Em comparação com collagenases de origem bacteriana, as proteases extraídas de fontes eucarióticas, seja animal, vegetal ou microbiana, apresentam sítios de reconhecimento mais específicos, o que aumenta sua eficiência na hidrólise da molécula proteica (BHAGWAT & DANDGE, 2018). No entanto, devido a limitações quanto ao uso de fontes animais terrestres para a extração de enzimas, são exploradas cada vez mais as fontes animais aquáticas, especialmente resíduos industriais. Dentre esses, se destacam as vísceras de peixe, que têm grande potencial biotecnológico como fonte de enzimas digestivas como serinorroteases com atividade colagenolítica, que apresentam alta atividade sob variações de pH e temperatura e em baixas concentrações. Dessa forma, esse subproduto é promissor quanto sua utilização para a extração de enzimas colagenolíticas (HAYET et al., 2011).

Existem variadas possibilidades para a utilização das proteases colagenolíticas, podendo ser aproveitadas pelas indústrias farmacêutica, biomédica, alimentícia, cosmética, entre outras, em diferentes aplicações. No campo médico e farmacêutico,

essas enzimas podem ser utilizadas para compor formulações terapêuticas devido a sua influência no processo de migração celular e remodelamento do colágeno, importantes no processo cicatricial (BHAGWAT & DANDGE, 2018).

Outro exemplo de potencial aplicação nessa área é o tratamento de pacientes com doenças que resultam no acúmulo de tecido fibroso em suas articulações ou até mesmo na forma de placas fibrosas em órgãos devido a deposição excessiva de colágeno. Nesses casos, o tratamento dos pacientes pode ser feito a partir da aplicação direta de collagenases capazes de degradar material fibroso, evitando que o paciente seja submetido ao tratamento cirúrgico (BHAGWAT & DANDGE, 2018).

Além de sua aplicação direta, essas enzimas podem ser empregadas pela indústria para a produção de peptídeos bioativos a partir de colágeno proveniente de diversas fontes, que por sua vez podem apresentar uma série de propriedades de acordo com suas características moleculares. Dentre essas propriedades pode-se destacar seu potencial antioxidante, antitumoral, cicatrizante, inibidora de enzima conversora de angiotensina (ECA), e seu papel na formação e manutenção óssea, propiciando sua utilização na formulação de alimentos e suplementos alimentares, além de cosméticos (LI *et al.*, 2020; ZHU *et al.*, 2020; FELICIAN *et al.*, 2019; KUMAR *et al.*, 2019).

2.3 Técnicas de separação de biomoléculas

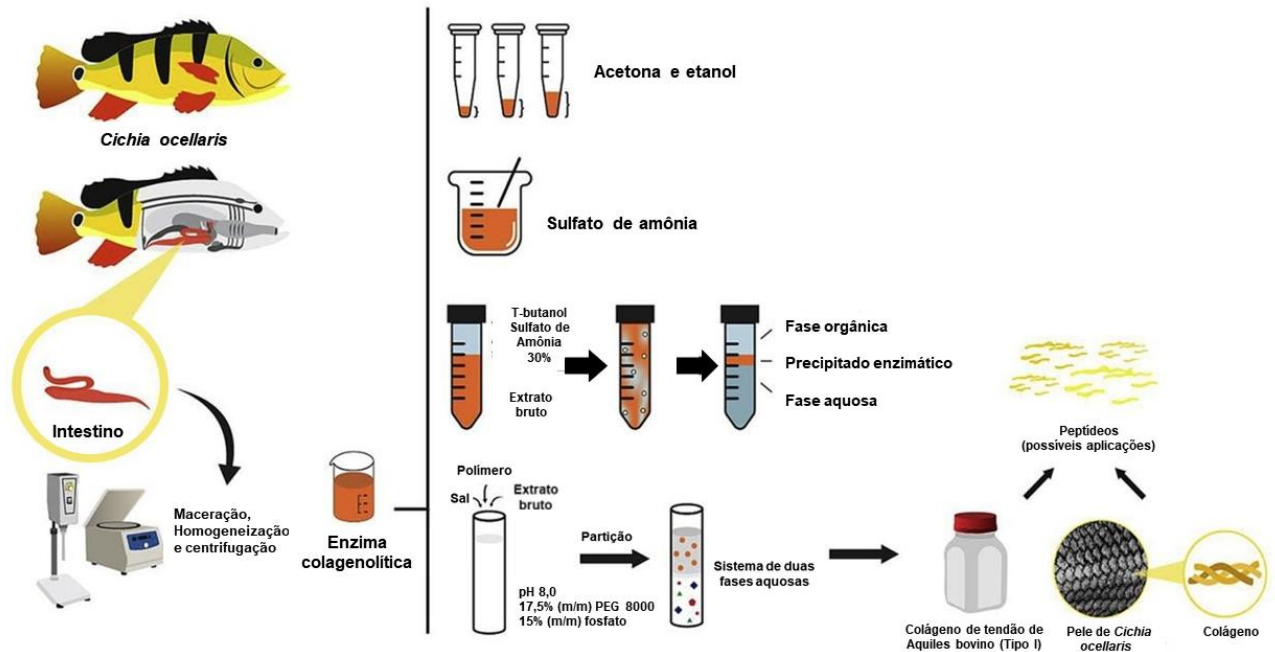
A aplicação de biomoléculas no processo industrial para produção de alimentos, fármacos, cosméticos e material têxtil chama a atenção da biotecnologia para o aprimoramento de técnicas de extração e isolamento das mesmas, focando na obtenção do maior nível de pureza possível do produto. No entanto, esse processamento envolve uma série de etapas complexas até que se alcance a separação e recuperação do produto biológico livre de impurezas, o que demanda uma quantidade considerável de energia, além de terem um alto custo, podendo corresponder a até 70% do custo do produto final (SANKARAN *et al.*, 2019; CARTA & JUNGBAUER, 2010).

No caso de proteínas, o processo de purificação se torna ainda mais oneroso, visto que essas moléculas são bastante sensíveis à fatores externos (temperatura, pH) e exigem condições específicas para que não se desnaturem durante o processo de purificação. A busca por proteínas empregadas para diversos fins industriais, tais como farmacêutico, biomédico, alimentício, têxtil, químico, cosmético, nutracêutico,

acarretou na necessidade de investigação de técnicas alternativas de isolamento, uma vez que o custo de produção pelo emprego de técnicas habituais e rotineiras tem, muitas vezes, inviabilizado o procedimento de obtenção em larga escala, tendo em vista que praticamente de 30 até 80% do custo do processo corresponda quase que exclusivamente a essa etapa. Dessa forma, atualmente se objetiva aprimorar e desenvolver processos de purificação e recuperação que sejam igualmente efetivos e econômicos (SANKARAN et al., 2019).

É interessante que a indústria pesqueira use técnicas simples, rápidas e de baixo custo para a separação e purificação de biomoléculas proteicas obtidas a partir de resíduos de beneficiamento de subprodutos de peixes, como precipitação usando orgânicos solventes (acetona, etanol, por exemplo) ou solução salina (sulfato de amônio $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, por exemplo), ou mesmo estágios sucessivos de centrifugação e filtração, visando melhorar o grau de pureza da biomolécula, como ilustrado na figura 2. Outra técnica de biosseparação aplicada a organismos aquáticos, os sistemas aquosos em fases, são usados como um método não cromatográfico para extração, recuperação e purificação de moléculas-alvo, especialmente proteases. Sua eficiência está relacionada ao estudo e análise de seus componentes, a fim de obter um alto fator de purificação (PF), rendimento (Y) e atividade específica da biomolécula de interesse, tópico que será descrito adiante.

Figura 2. Ilustração de técnicas de separação e purificação de biomoléculas de organismos aquáticos.



Fonte. Adaptado de Oliveira *et al.* (2020).

2.3.1 Precipitação

As técnicas de precipitação são classificadas como métodos de purificação de baixa resolução e são algumas das práticas mais tradicionalmente empregadas para a purificação e concentração de proteínas, apesar de sua baixa capacidade de separação. A técnica se baseia no aumento da concentração de proteínas pela promoção da redução do volume inicial. Sendo assim, as técnicas de precipitação usualmente são realizadas em conjunto com outras técnicas de maior resolução, como a cromatografia (PESSOA JÚNIOR & KILIKIAN, 2001).

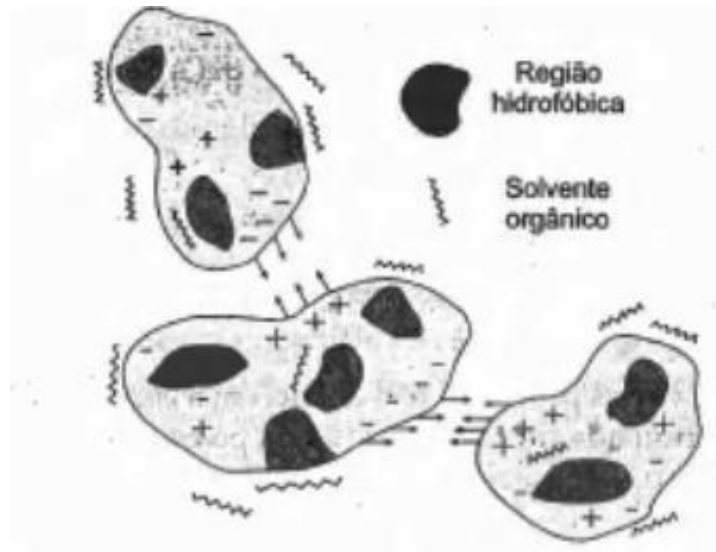
Há diferentes metodologias para a realização da precipitação. É possível precipitar proteínas fazendo uso de sais ou solventes orgânicos. Os sais a serem utilizados precisam ter alta solubilidade, além de aumentar a tensão superficial do solvente, sendo os mais empregados o citrato de sódio, o sulfato de sódio e o sulfato de amônio. Os solventes orgânicos, como álcoois e a acetona promovem a precipitação pela diminuição da atividade da água e redução da sua constante dielétrica, ou seja, esses solventes limitam a capacidade da água de interagir com a superfície da molécula

proteica (PESSOA JÚNIOR & KILIKIAN, 2001).

A precipitação salina de proteínas se dá por um fenômeno denominado *salting out*. Durante esse processo, a adição de sais acarreta na hidratação dos mesmos, diminuindo a disponibilidade de moléculas de água que entram em contato com a superfície das proteínas e estimulando a interação entre as zonas hidrofóbicas das estruturas proteicas, que tendem então a precipitar. A alta concentração salina forma um ambiente agressivo para as proteínas, e estas geralmente perdem sua conformação funcional por conta do processo. Diz-se então que a precipitação é bem sucedida quando é possível recuperar a conformação e função originais da proteína precipitada (PESSOA JÚNIOR & KILIKIAN, 2001).

Durante a precipitação por solventes, a alteração da conformação da proteína se dá pela interação com o mesmo, pois este afasta a camada de hidratação próxima as zonas hidrofóbicas na molécula e passa a circundá-la (Figura 3). Porém, a realização desse processo sob baixas temperaturas tende a diminuir esse efeito, pois torna a molécula proteica menos flexível, limitando a penetração do solvente. Assim, na aplicação em larga escala da precipitação com uso de solventes, um dos maiores desafios é o controle das trocas de calor, que podem resultar na redução da quantidade e qualidade do produto (PESSOA JÚNIOR & KILIKIAN, 2001).

Figura 3. Formação de agregado proteico por interações entre superfícies com cargas opostas em meio aquoso contendo solvente orgânico.



Fonte: Pessoa Júnior & Kilikian (2001).

2.3.2 Purificação por particionamento

Proteínas, que são altamente sensíveis às condições externas, como temperatura e pH, podem ser submetidas a técnicas purificação em sistemas de fases aquosas. Nesses métodos, a extração da proteína se dá pela partição distinta entre a molécula alvo e impurezas da amostra. Sendo assim, os métodos de particionamento se baseiam na migração das moléculas de interesse para uma fase do sistema, enquanto as impurezas migram para outra fase (BORZANI et al., 2001).

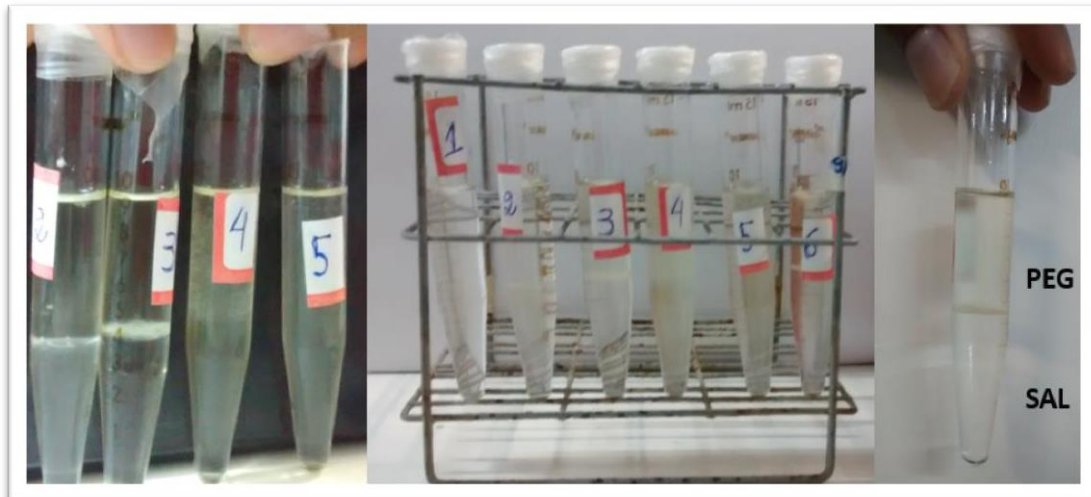
As técnicas de particionamento geralmente são os primeiros passos tomados no processo de purificação da molécula biológica de interesse, porém, em alguns casos, podem até mesmo substituir etapas posteriores de cromatografia (SILVA & LOH, 2006). Essas técnicas compreendem metodologias que visam simplificar o processo de purificação, além de obter o maior grau possível de separação com o melhor custo-benefício, afim de tornar sua aplicação industrial em larga escala economicamente viável. Dentre os utilizados atualmente, estão o particionamento em sistema bifásico e o realizado em meio trifásico.

Sistema Bifásico

A extração líquido-líquido (ELL) realizada através do sistemas de duas fases

aquosas (SDFAs) é uma técnica empregada para extração ou purificação parcial de compostos biológicos. Sua aplicação para a recuperação de biomoléculas requer que estejam presentes no sistema condições físico-químicas (temperatura e pH) semelhantes às do organismo vivo, para que se evite a degradação/perda de atividade das moléculas de interesse (SILVA & LOH, 2006). Os SDFAs são compostos por dois polímeros e água, e/ou por um polímero, um sal inorgânico e água, respectivamente. Outros tipos de sistemas podem incluir líquidos iônicos e álcoois de cadeia curta. Nesses sistemas, são formadas duas fases: uma superior, ou rica no polímero, e uma inferior, ou fase rica no sal (Figura 4).

Figura 4. Montagem de um sistema de duas fases aquosas (SDFAs).



Fonte:

Oliveira et al. (2017).

Os SDFAs são constituídos predominantemente por água, propiciando um ambiente ameno para as moléculas em solução, evitando modificações em sua estrutura, de forma a corroborar com sua manutenção (SILVA & LOH, 2006). A partir de trabalhos pioneiros, foram investigadas centenas de combinações possíveis para os componentes de SDFAs, visando a descoberta, caracterização e aplicação de novos sistemas para a separação de solutos específicos (Tabela 1). Assim, a formação das duas fases diferentes dar-se-á pela incompatibilidade geralmente encontrada entre soluções de polímeros em diferentes concentrações, assim como entre a mistura de um polímero com um sal de alta força iônica. Nos sistemas polímero/sal a formação de fases se deve a grande absorção de água pelo sal, desencadeando o mesmo fenômeno de exclusão (IQBAL et al., 2016).

Tabela 1. Tipos de SDFAs e seus resultados.

Tipos de SDFAs	<u>Exemplos representativos</u>		
	Composição do S DFA	Produto	Resultados
Polímero/Polímero	PEG - Dextrano	Quitinase	Particionamento bem-sucedido da quitinase na fase inferior
Polímero/sal	PEG – K ₂ HPO ₄	B-fitoeritrina	Rendimento de recuperação = 90% Fator de purificação = 4
Álcool/sal	2-propanol – K ₂ HPO ₄	Lipase	Rendimento de recuperação = 99% Fator de purificação = 13,5

Adaptado de Iqbal et al. (2016).

A natureza química e interação entre os componentes das fases tem grande influência sobre as propriedades do sistema, como a distribuição de seus elementos, a relação de volumes entre as fases e o coeficiente de partição de um soluto específico. A separação das fases em SDFAs é influenciada por fatores como concentração e peso molecular do polímero e concentração e composição do sal utilizado. Três forças atuam durante a separação das fases, e o equilíbrio entre elas determina seu movimento. São elas: força gravitacional, flotação e fricção. A primeira depende da densidade do material enquanto as duas últimas dependem do fluxo das fases. A falta de conhecimento presente sobre o comportamento de partição ainda é uma barreira para a adaptação de SDFAs em nível comercial para a purificação de biomoléculas (IQBAL et al., 2016; SILVA & LOH, 2006).

As propriedades físico-químicas dos solutos empregados são os principais parâmetros utilizados para otimização dos sistemas. Entre os fatores que influenciam o particionamento em SDFAs, estão: a massa molar e concentração do polímero (quanto maior a massa molar do polímero, menor a concentração necessária para que ocorra a formação das fases), pH (o pH do sistema pode alterar a carga da molécula de interesse e afetar seu particionamento. Por exemplo, é reportado que

moléculas carregadas negativamente tendem a migrar para a fase superior em sistemas de pH alto) e temperatura (pode influenciar a viscosidade e densidade das fases, afetando o comportamento de particionamento) (IQBAL et al., 2016).

Sistema Trifásico

Também chamado TPP, o sistema trifásico representa mais uma alternativa aos métodos cromatográficos de estratégia versátil e economicamente viável a ser empregada pela indústria no processo de purificação em larga escala de macromoléculas (como proteases), com uma gama de aplicações possíveis. No processo de purificação de proteínas, a separação das moléculas de interesse ocorre quando o extrato bruto proteico é misturado a um sal (como sulfato de amônio $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$) e um solvente orgânico (como t-butanol), resultando na formação de três fases por conta da baixa afinidade entre o solvente e o sal. Assim, serão formadas uma fase superior constituída pelo solvente orgânico, onde ficarão retidos os componentes não-polares (como impurezas da amostra), uma fase inferior aquosa contendo os elementos polares (como proteínas, carboidratos, etc.) e uma interfase formada pelo precipitado proteico (GAGAOUA & HAFID, 2016).

A composição do sistema pode ser selecionada e otimizada de acordo com sua eficiência e interação com a molécula que se deseja extrair, visto que sistemas trifásicos são aplicáveis na purificação de inúmeras proteases. Assim, parâmetros como a quantidade de sulfato de amônio, a razão extrato bruto/t-butanol e o pH podem ser modificados para a obtenção de maior nível de pureza e rendimento. A proporção extrato/t-butanol se mostra especialmente significativa, pois, apesar de o t-butanol ser considerado o melhor solvente orgânico para o método (por obter resultados positivos na separação de proteínas e pouca possibilidade de desnaturação proteica por conta do seu tamanho molecular), se a quantidade do solvente for baixa demais, não há uma interação adequada com o $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ e caso seja alta demais, a tendência é que ocorra desnaturação proteica (CHEW et al., 2018; GAGAOUA & HAFID, 2016).

O processo de extração é barateado e simplificado com o emprego do particionamento por sistema trifásico. Além do fator econômico, TPPs se mostram vantajosos quando comparado a outras metodologias. Por exemplo, as propriedades do sulfato de amônio e do t-butanol (particularidade de TPPs) aumentam a habilidade

do sistema para a precipitação de proteínas. Isso o torna ainda superior ao processo de precipitação com solventes orgânicos, visto que, em quanto as técnicas de precipitação devem ser feitas sob temperaturas baixas, os sistemas trifásicos podem ser feitos à temperatura ambiente, pois oferecem um ambiente favorável à manutenção da estrutura molecular proteica (CHEW et al., 2018).

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

Recuperar e purificar parcialmente proteases colagenolíticas de vísceras digestivas de tainha (*Mugil liza*) com potencial aplicação biotecnológica.

3.2 Objetivos Específicos

- Extrair protease colagenolítica de vísceras digestivas de tainha (*M. liza*);
- Precipitar protease colagenolítica extraída de vísceras de de tainha (*M. liza*) utilizando solvente orgânico e solução salina;
- Particionar protease colagenolítica de tainha (*Mugil liza*) utilizando sistema de duas fases aquosas (PEG/citrato) e sistema trifásico (t-butanol/sulfato de amônia).

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. Obtenção do material biológico

A espécie utilizada foi a tainha (*Mugil liza*). As vísceras digestivas (intestino, fígado e uma mistura de vísceras internas) utilizadas foram provenientes da evisceração desses peixes capturados pela associação de pescadores artesanais do Pina, Recife, Pernambuco, Brasil. Após a etapa de limpeza externa e evisceração, realizada pelos pescadores, os resíduos sólidos rejeitados/descartados foram selecionados e tratados separadamente ou através da formação de uma mistura de vísceras, para posterior recuperação de proteases totais e de proteases colagenolíticas.

4.2 Extração de proteases colagenolíticas

A etapa de extração enzimática foi realizada como método descrito por Oliveira et al. (2019), onde as vísceras (intestino, fígado e mistura de vísceras) foram pesadas e maceradas em almofariz de porcelana (148mm de diâmetro) com pistilo, durante 5 minutos, para em seguida serem homogeneizadas na proporção de 1:3 de tecido para tampão de extração (0.05 M Tris-HCl pH 7.5, contendo 5 mM CaCl_2), durante 5 minutos a 4 °C, em intervalos de 2 minutos, utilizando um homogeneizador, modelo RW 20 S32 (IKA, Guangzhou, China). Após essa etapa, o material foi centrifugado (SorvallSuperspeed RC-6, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, EUA) durante 25 minutos, a 10.000 rpm a 4°C. Após a centrifugação, o precipitado foi descartado, enquanto o sobrenadante foi pré-aquecido por 20 minutos a 45°C para seleção de proteases termoestáveis, sendo, em seguida, novamente centrifugado. O segundo sobrenadante foi definido como extrato bruto (EB) final. Ao final deste processo foram obtidos três amostras de extrato bruto, correspondentes aos três tipos de vísceras analisadas.

4.3 Etapas de separação

4.3.1 Precipitação salina

Os extratos de fígado, intestino e mistura de vísceras internas passaram por um processo de precipitação com sulfato de amônia ($(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$) nas concentrações de 0-30%, 30-60% e 60-90%, segundo descrito por Oliveira et al. (2020).

Recuperação e fator de purificação

Para calcular a recuperação e a eficiência da purificação parcial foram utilizadas as seguintes equações (DANTAS, 2017):

Atividade específica (U/mg de proteína): atividade enzimática (U/mL)/proteínas totais(mg/mL)

Rendimento (%): (atividade específica do material precipitado/atividade enzimática do extratobruto) x 100

Fator de purificação: atividade específica do material precipitado/atividade específica do extrato bruto enzimático.

4.3.2 Sistema de duas fases aquosas (SDFA)

Para constituição do SDFA foi usada uma solução concentrada de sal de citrato de sódio (30%) constituída pela combinação de citrato de sódio e ácido cítrico (pH 7,0). Em cada um dos tubos, adicionou-se a solução concentrada de sal de citrato de sódio e PEG.

Logo em seguida a adição do PEG o tubo foi tampado e agitado em vórtex para que ocorresse a homogeneização. A próxima etapa consistiu da adição de 2g da amostra e posterior agitação em vórtex por 1 min, a separação ocorreu por decantação por um período de 1 hora. Para a composição do branco do sistema, repete-se todas as etapas, porém com a adição de água no lugar da amostra. Após a formação das fases, o volume de cada fase foi medido, as amostras de ambas as fases (superior fase (PEG) e inferior fase (Sal)) foram separadas e analisadas quanto seu teor de proteína total e atividade proteásica e atividade colagenolítica.

As concentrações do PEG, do citrato de sódio, a massa molar do PEG diferenciaram-se conforme o planejamento fatorial 2^3 apresentados na Tabela 2.

Tabela 2. Níveis das variáveis do planejamento fatorial 2^3 na purificação da protease colagenolítica através do SDFA (PEG/citrato).

Variáveis	Níveis		
	Menor (-1)	Central	Maior (+)
Massa molar PEG (g/mol)	400	3350	8000
Concentração PEG (%)	20	22	24
Concentração citrato de sódio (%)	15	17,5	20

4.3.2.1 Determinação do coeficiente de partição, fator de purificação e recuperação

Os parâmetros coeficiente de partição (K), recuperação (Y) e fator de purificação (FP) das proteases foram calculados usando as seguintes equações, como descrito por Silva et al. (2018).

O coeficiente de partição (K) é definido como a razão entre a atividade enzimática (protease ou colagenase) da fase superior (A_T) e a atividade enzimática volumétrica da fase inferior (A_B):

$$K = \left(\frac{A_T}{A_B} \right)$$

A recuperação em atividade (Y) é definida como a razão entre a atividade da fase (A_T) (protease ou colagenase) multiplicado pelo volume da fase superior (V_T) e a atividade do extrato bruto (A_{EB}) multiplicado pelo volume do extrato enzimático bruto (V_{EB}):

$$Y = \left(\frac{A_T V_T}{A_{EB} V_{EB}} \right) \times 100$$

O fator de purificação (FP) é definido como a razão entre a atividade específica na fase superior (AE_T) e a atividade específica do extrato enzimático bruto (AE_{EB}):

$$FP = \left(\frac{AE_T}{AE_{EB}} \right)$$

Onde a atividade específica da fase ou do extrato bruto é a razão entre a sua atividade total e sua concentração total de proteínas.

4.3.3 *Particionamento trifásico*

A TPP foi realizada conforme descrito por Rawdkuenet et al. (2012). O efeito da razão entre o extrato bruto e o *t*-butanol foi estudado. Primeiro, o *t*-butanol foi adicionado ao extrato bruto nas diferentes proporções (v/v) do extrato bruto em *t*-butanol (1,0: 0,5, 1,0: 1,0, 1,0: 1,5 e 1,0: 2,0), com uma concentração constante de sulfato de amônia (NH₄)₂SO₄ de 30% (p/v). A solução foi bem misturada e submetida a centrifugação a 5000xg por 10 minutos para facilitar a separação das fases. A camada aquosa inferior e o precipitado interfacial foram recolhidos e dialisados contra água durante a noite a 4 °C. Após diálise, as amostras foram analisadas quanto ao conteúdo total de proteína, à atividade de protease e a atividade colagenolítica.

4.4 **Determinações analíticas**

4.4.1 *Determinação de proteínas totais*

A concentração de proteína totais foi determinada de acordo Smith *et al.* (1985).

4.4.2 *Atividade colagenolítica*

As propriedades colagenolíticas foram determinadas de acordo com a metodologia modificada descrita por Oliveira et al. (2019), utilizando azocoll como substrato. Uma mistura de reação, contendo 5 mg de azocoll, 500 µl de 50 mM Tris-HCl (pH 7,5) que continha CaCl₂ 5 mM e 500 µl de extrato enzimático, foram incubados a 55°C durante 30 minutos, sob agitação constante e em quadruplicata. Posteriormente, foram adicionados 200 µl de ácido tricloroacético (TCA) e incubadas para parar a reação. Após 10 minutos, as amostras foram centrifugadas (Centrífuga SorvallSuperspeed RC-6, Carolina do Norte, EUA) a 10.000 xg durante 10 minutos a 4°C. A leitura da amostra foi realizada com espectrofotômetro em um comprimento de onda de 595 nm. Uma unidade de enzima foi definida como a quantidade de enzima necessária para aumentar a absorção de 0,01 a 595 nm.

4.4.3 *Atividade proteolítica total*

As atividades das proteases totais foram avaliadas usando azocaseína como substrato, utilizando microplacas e o leitor ELISA. Em triplicata, utilizando tubos de microcentrífuga, 50 µl de azocaseína a 1% (p/v) (Sigma), preparado em 0,2 M Tris-HCl pH 7,5, foi incubado com 30 µl de extrato bruto durante 60 minutos a 25°C. Após esse período, foram adicionados 240 µL de ácido tricloroacético (TCA) 10% (p/v) para parar a reação. Após 15 minutos em repouso, os tubos foram centrifugados por um período de 5 minutos a 8.000xg. em seguida, 70 µl do sobrenadante foram então adicionados a 130 µl de NaOH 1 M em uma microplaca de ELISA e a absorbância da mistura foi mensurada medida num leitor ELISA (Bio-rad 550) a 450 nm contra um branco preparado da mesma maneira. Uma unidade (U) de atividade enzimática foi definida como a quantidade de enzima para hidrolisar a azocaseína, dando um aumento de 0,001 unidades de absorbância por minuto (ALENCAR *et al.*, 2003).

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

O extrato bruto (EB) obtido a partir das vísceras intestinais da Tainha (M, Liza) apresentou as seguintes atividades: 0,74 U/mg de proteínas totais; 119,26 U/mg de atividade colagenolítica volumétrica; 159,17 U/mg de atividade colagenolítica específica; 9,45 U/mL de atividade proteolítica/proteásica; e, por fim, 12,61 mg/mL de atividade proteolítica específica.

Os valores de atividade colagenolítica específica do extrato bruto de intestino de tainha são superiores aos encontrados na literatura, como os descritos para as espécies de surubim *Pseudoplaty stomacorruscans* (15,95 U/mg), jaguar (*Parachromis managuensis*) (31,98 U/mg), ariocó (*Lutjanus synagris*) (35,18 U/mg), cavala (*Scomberomorus mackerel*) (46,88 U/mg), beijupirá (*Rachycentron canadum*) (52,13 U/mg), tilápia-do-nilo (*Oreochromis niloticus*) (58,27 U/mg), tambaqui (*Colossoma macropomum*) (66,68 U/mg) e tucunaré (*Cichla ocellaris*) (94,35 U/mg) (OLIVEIRA et al., 2019).

Yoshinaka et al. (1978) investigaram o local da produção de collagenase em diferentes órgãos de espécies de peixes que compreendem o sistema digestivo (fígado, estômago, intestino), como a sardinha (*Sardinops melanosticta*) (34,3 U/mg de intestino), truta arco-íris (*Salmo gairdnerii*) (2,8 e 36,8 U/mg de fígado e intestino, respectivamente), carpa comum (*Cyprinus carpio*) (10,4 U /mg intestino posterior), enguia (*Anguilla japonica*) (1,1 e 33,9 U/mg de estômago e intestino, respectivamente). Os autores observaram que porções intestino, ceco pilórico, mesentério, pâncreas e tecido adiposo são ricos em collagenases, evidenciando sua potencialidade.

Dados descritos por Oliveira et al. (2017) para uma espécie de pescada branca (*Cynoscion leiarchus*) corroboram com a potencialidade das espécies neotropicais (22,0 U/mL e 72,5 U/mg em vísceras de intestino; e de 39,02 I/mL e 9,82 U/mg para resíduos de músculo).

5.1 Aplicação da técnica de precipitação

A precipitação é uma forma de separação que altera o potencial de solvência do solvente, diminuindo a solubilidade do soluto, muitas vezes empregada como única forma de purificação (parcial), ou mesmo de pré-purificação na extração de proteínas de espécies de peixes tropicais e neotropicais (OLIVEIRA et al., 2020). Aqui, as séries de eficiência na concentração da protease colagenolítica da tainha estão descritas de

forma otimizar sua utilização nas etapas de beneficiamento do pescado e contribuir pela busca por um método rápido, eficiente e de baixo custo.

A precipitação de vísceras intestinais com $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ indicou uma alta recuperação nas frações 0-30% e 30-60%, como ilustrado na Tabela 3. Ainda, o maior fator de purificação (5,34) foi observado na fração 30-60%. O resultado foi reflexo do aumento da atividade colagenolítica volumétrica e específica do extrato bruto em relação ao material precipitado com o sal de amônia (188,0 U/mL e 954,77 mg/mL).

O uso do $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ no extrato bruto de fígado também indicou alta recuperação nas frações 0-30%, 30-60% e 60-90%, como apresentado na tabela 3. O maior fator de purificação foi evidenciado na fração 30-60%, obtendo-se 3,4, quando comparado ao extrato bruto enzimático (1,0). A atividade volumétrica e específica da colagenase extraída foi de 383,4 U/mL e 726,98 U/mg, respectivamente, evidenciando o potencial do fígado no fornecimento desse tipo de protease. Por fim, foi empregado o $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ numa mistura de vísceras internas, obtendo-se maior recuperação e fator de purificação na fração 30-60% (100,47% e 1,86, respectivamente. A utilização de tecnologias simples foi empregada por Oliveira et al. (2019) ao utilizar diferentes formas de separação por centrifugação para obtenção de proteases de *C. ocellaris* a partir de vísceras internas (intestino, fígado, estômago, coração e resquícios de músculos). Segundo os autores, o intestino foi a víscera com maior concentração de protease, sendo altamente indicada para pesquisas posteriores com proteases de interesse industrial, como a colagenase.

Tabela 3. Precipitação salina da protease colagenolítica de vísceras internas de tainha (*M. liza*).

Concentrações/Vísceras	Proteínas totais (U/mg)	Atividade colagenolítica (U/mL)	Atividade colagenolítica (U/mg)	Y (%)	FP
<i>Intestino</i>					
0-30%	0,893	445,2	498,4	276,6	2,791
30-60%	0,196	188	954,7	116,8	5,346
60-90%	0,539	117,4	217,5	72,94	1,217
<i>Fígado</i>					
0-30%	0,585	356,2	608,8	157,1	2,860
30-60%	0,527	383,4	726,9	320,6	3,415
60-90%	0,182	123,4	675,7	298	3,174
<i>Mix</i>					
0-30%	-0,208	485,6	-2330,88	99,7	0
30-60%	0,705	489	693,6	100,4	1,861
60-90%	0,454	263,8	580,3	54,2	1,557

Utilizando o $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ para precipitação e pré-purificação de protease colagenolítica de tucunré (*Cichlaocellares*), Oliveira *et al.* (2020) observaram aumento da recuperação e da atividade colagenolítica nas frações 0-30% (395,14 U/mg), 30-60% (428,21 U/mg) e 60-90% (246,56 U/mg), com fator de purificação de 3,95, 4,28 e de 2,46, respectivamente; de recuperação de 157,12%, 201,85% e de 116,22%, respectivamente. A presença de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ desloca a água da camada de solvatação da proteína, causando perda de interação com a água, reduzindo a interação proteína-proteína e precipitando (ANDEVARI *et al.*, 2019; NOVÁK & HAVLÍČEK, 2016; OLIVEIRA *et al.*, 2020).

5.2 Aplicação do sistema de duas fases aquosas (SDFA)

O Sistema de duas fases aquosas (PEG/citrato) foi utilizado para recuperar proteases e proteases colagenolíticas do EB obtido de vísceras intestinais de tainha (*M. liza*). Além disso, foram avaliados: atividade colagenolítica, cálculos do coeficiente de partição, índice de recuperação, fator de purificação e análises estatísticas de todo sistema. Os resultados obtidos de acordo com o planejamento fatorial 2³ estão descritos na Tabela 4.

Tabela 4. Resultados do planejamento fatorial 2³ na partição da enzima colagenase através do SDFA PEG/citrato.

Ensaio	MMPEG	C.PEG %	C.Cit %	AC. PEG	K	Y PEG %	FP PEG
01	400	20	15	-	-	-	-
02	8000	20	15	285,133	1,77	422,04	0,69
03	400	24	15	-	-	-	-
04	8000	24	15	294,300	2,97	435,61	1,03
05	400	20	20	183,700	5,30	299,10	0,98
06	8000	20	20	240,300	3,44	355,68	0,58
07	400	24	20	163,567	4,52	242,11	1,07
08	8000	24	20	255,633	4,95	378,38	0,52
09(C)	3350	22	17,5	245,233	1,76	344,84	0,78
10(C)	3350	22	17,5	251,933	2,38	391,55	0,91
11(C)	3350	22	17,5	352,133	2,65	521,22	1,39
12(C)	3350	22	17,5	154,800	1,17	206,22	0,59

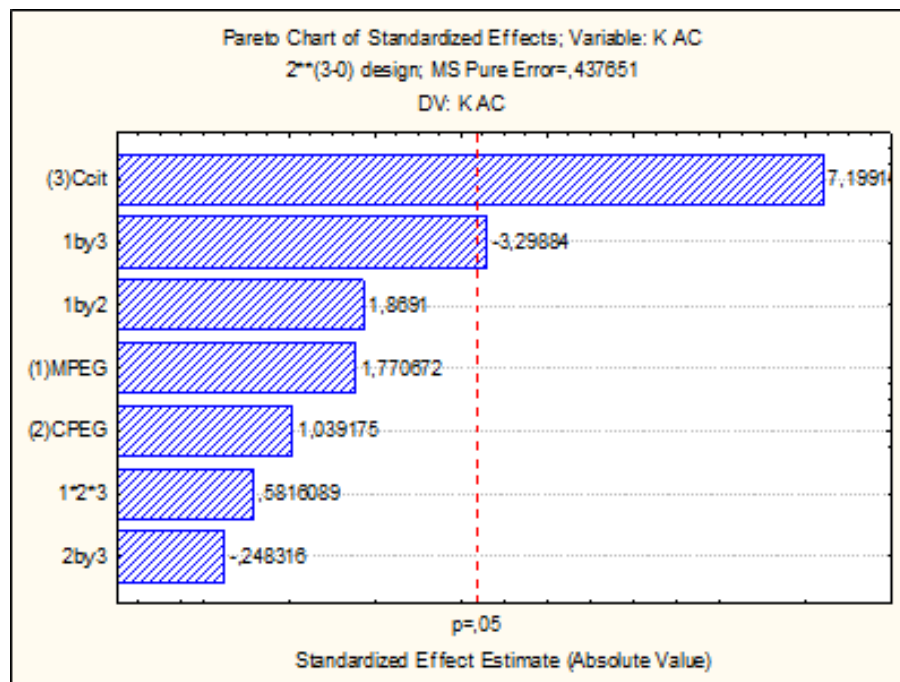
MMPEG = massa molar do PEG; C.PEG% = concentração do PEG; C.Cit % = concentração citrato de sódio; (C) = ponto central; AC. SAL = atividade de colagenolítica da fase rica em sal; AC. PEG = atividade de colagenolítica da fase rica em PEG; K = coeficiente de partição; Y PEG % = índice de recuperação da fase rica em PEG; FP PEG = fator de purificação da fase rica em PEG.

A tabela 4 mostra os resultados obtidos para a fase PEG, que possuem os melhores valores para a atividade colagenolítica. Isso representa que em todos os ensaios, o coeficiente de partição (K) teve preferência pela fase superior (PEG). O

ensaio 11 obteve o maior fator de purificação nas seguintes condições: massa molar do PEG 3350 g/mol; concentração do PEG 22%; concentração do citrato 17,5%. Ainda observando a tabela 4, pode ser observado que os nos ensaios 1 e 3 não houve formação de fases.

No gráfico de Pareto (Figura 5), a linha vertical indica os efeitos considerados significativos, as barras que se estendem após esta linha correspondem aos efeitos estatisticamente significativos. De acordo com a figura 5, pode ser visto que a concentração do citrato de sódio (C.cit) e a interação entre a MPEG e a Ccit foram as mais significativas sobre o K.

Figura 5. Gráfico de Pareto dos principais efeitos tendo como variável resposta o coeficiente de partição (K).

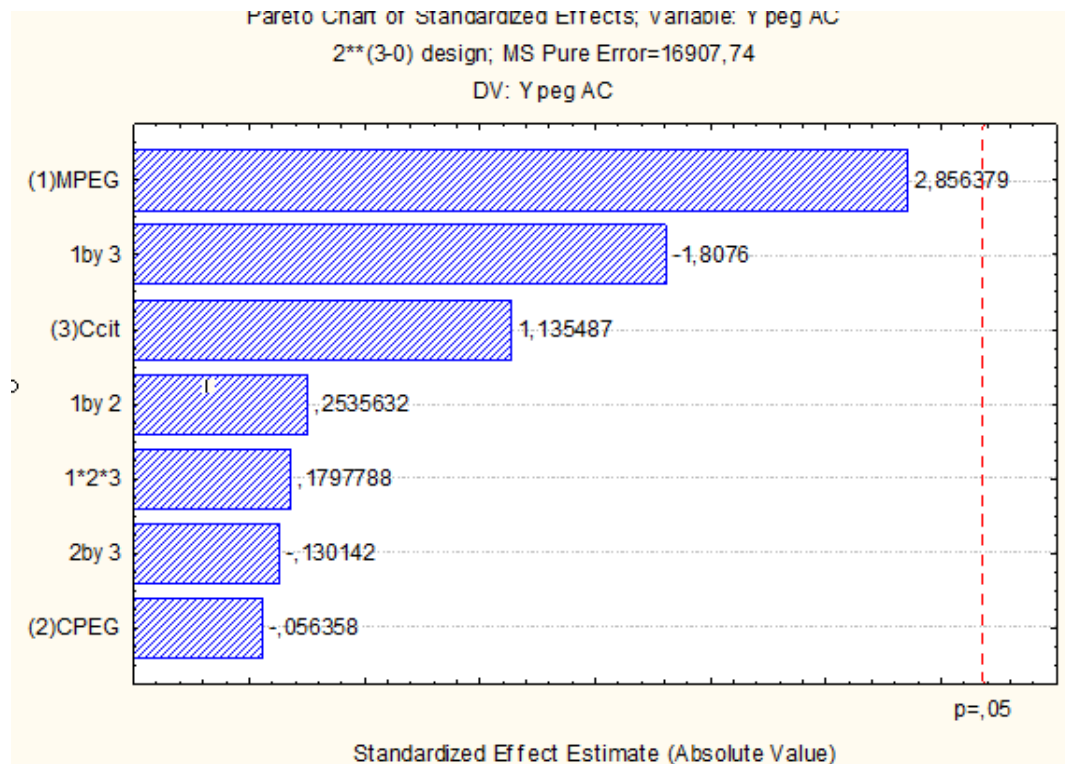


Babu et al. (2008), ao empregar o SDFa PEG/Fosfato, observaram que em elevadas concentrações de sal a colagenase torna-se pouco solúvel na fase rica em sal e particiona para a fase topo, sob o efeito *salting-out*. Jönsson & Johansson (2003) demonstram que diferentes tipos de sal possuem diferentes capacidades de gerar o efeito *salting-out*.

Resultados semelhantes aos nossos foram obtidos por Sales et al. (2013), que utilizaram o sistema PEG/Citrato para a purificação de proteases fibrinolíticas de *Bacillus* sp. e também observaram que houve um particionamento dessas proteases para a fase rica em PEG. Esses autores observaram a presença de uma interação

entre as variáveis massa molar do PEG e concentração do sal aumentavam a atividade enzimática. A figura 6 mostra que nenhum das variáveis teve efeito significativo sobre a variável rendimento (Y).

Figura 6. Gráfico de Pareto dos principais efeitos sobre variáveis sobre o rendimento para a atividade colagenolítica.



A concentração de citrato gerou um maior efeito sobre o particionamento da colagenase, onde o aumento de sua concentração aumenta os valores do coeficiente de partição. Já o aumento da concentração do PEG possui o efeito inverso, onde maiores concentrações geram menores taxas de particionamento.

Wanderley et al. (2017) e Rosso et al. (2012) obtiveram resultados distintos dos apresentados no presente trabalho. Em seus ensaios esses autores observaram que a colagenase particionou para a fase rica em sal. Uma explicação para essa diferença pode estar relacionada com o uso de diferentes tipos de sal utilizado por eles, onde o sistema aquoso de duas fases utilizado foi o PEG/Fosfato. No entanto os presentes resultados demonstraram que o aumento nas concentrações do citrato elevou o valor do K, sendo a única variável independente que teve influencia para esta resposta (Tabela 4), indicando que o particionamento da colagenase para a fase rica em sal

não ocorreu devido ao efeito *salting out*. Uma explicação mais plausível para esse resultado pode estar relacionada as interações específicas entre a proteína e o polímero (JONSSON & JOHANSSON, 2003). De acordo com Bockle et al. (1995) a interação entre a colagenase e o PEG se dá devido a presença de domínios hidrofóbicos nessa enzima. Tais domínios hidrofóbicos são formados por resíduos de metioninas presentes nas colagenases (BODE; GOMIS-RÜTH; STÖCKLER, 1993; STÖCKLER & BODE, 1995), sendo esses domínios os responsáveis pela interação colagenase/PEG. Esse fenômeno, combinado com ao efeito *salting out* apresentado propiciou a recuperação desta enzima na fase superior do sistema.

5.3 Aplicação so sistema trifásico (TPP)

O extrato bruto intestinal foi submetido ao particionamento trifásico e seus resultados estão ilustrados na Tabela 5. A relação de *t*-butanol e extrato bruto foram quantificados. A maior recuperação de protease colagenolítica foi observada na proporção de 1:0,5, obtendo-se recuperação de 240,01% e um fator de purificação de 2,55, o maior entre todos os ensaios realizados. Resultados similares foram descritos para resíduos de bagre gigante (*Pangasianodon gigas*) reportado por Rawdkuen et al. (2012). Segundo os autores, os resultados podem ser atribuídos à sinergia efeitos do aumento da concentração de *t*-butanol e da diminuição na saturação do sulfato de amônio.

Tabela 5. Particionamento trifásico (TPP) de extrato bruto intestinal de tainha (*Mugil liza*)

Proporção extrato/ t-butanol	Atividade colagenolítica (U/mg)	Y (%)	FP
1:0,5 (Superior)	40,8	18,02	0,57
1:0,5 (Intermediária)	40,8	240,01	2,55
1:0,5 (Inferior)	58	84,41	0,89
1:1 (Superior)	35,8	57,52	0,61
1:1 (Intermediária)	141	238,56	2,54
1:1 (Inferior)	37,1	82,39	0,87
1:1,5 (Superior)	50,3	103,49	1,10
1:1,5 (Intermediária)	106,2	177,52	1,89
1:1,5 (Inferior)	49,5	123,84	1,31
1:2 (Superior)	39,8	89,81	0,95
1:2 (Intermediária)	15	24,06	0,25
1:2 (Inferior)	165,33	222,12	2,36

Quando o valor da proporção de *t*-butanol é superior a 1 a tendência é desnaturar a proteína (DENNISON e LOVRIEN, 1997; RAWDKUEN et al., 2012). Assim, a concentração que melhor definiu o experimento foi a de 1:0,5 (extrato bruto: *t*-butanol). Nesse tipo de sistema, potenciais inibidores de proteínatendem a ficar presos na fase superior. Uma terceira fase é formada (o intermediário) pelas proteínas presentes no meio (CHEW et al., 2018 ; LIU et al., 2019).

6. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Quando realizada a técnica de precipitação por sulfato de amônia, os maiores resultados obtidos de Fator de Purificação se deram nas concentrações 30-60% para todos os extratos analisados (intestino, fígado e mix); o sistema de duas fases aquosas (PEG/Citrato) realizado com extrato de vísceras intestinais de tainha demonstra que as condições: massa molar do PEG 3350 g/mol; concentração do PEG 22%; concentração do citrato 17,5%. apresentam o maior fator de purificação. Observa-se também que a colagenases tente aparticionar para a fase PEG; já para o sistema trifásico (t-butanol/ sulfato de amônia) o maior valor de recuperação de protease colagenolítica foi observada na proporção de 1:0,5, obtendo-se recuperação de 240,01% e um fator de purificação de 2,55.

Os resultados sugerem que os ensaios podem ser utilizados na recuperação de biomoléculas a partir de resíduos sólidos orgânicos negligenciados da indústria pesqueira. É sugestivo que outros resíduos passem pelo mesmo tipo de processamento, para possibilitar do um mapeamento da aplicabilidade desses métodos e sua eficiência frente a outras proteases, largamente presente nesses tipos de material.

7. REFERÊNCIAS

- AISSAOUI, N. et al. **Purification and Biochemical Characterization of a Neutral Serine Protease from Trichoderma reesei. Use in Antibacterial Peptide Production from a Fish By-Product Hydrolysate.** Applied Biochemistry and Biotechnology, v. 182, n. 2, p. 831-845, 2019.
- ALENCAR R.B. et al. **Alkaline proteases from digestive tract of four tropical fishes.** Brazilian Journal of Food Technology. V. 6, p. 279-284, 2003.
- ANDEVARI, G. T. et al. **Extraction, partial purification and characterization of alkaline protease from rainbow trout (Oncorhynchus Mykiss) viscera.** Aquaculture, v.500, p. 458-463, 2019.
- BABU, B. R.; RASTOGI, N. K.; RAGHAVARAO, K. S. M. S. **Liquid-liquid extraction of bromelain and polyphenol oxidase using aqueous two-phase system.** Chemical Engineering and Processing: process intensification, v. 47, n. 1, p. 83-89, 2008.
- BHAGWAT, P.; DANDGE, P. **Collagen and collagenolytic proteases: A review.** Biocatalysis and Agricultural Biotechnology, v. 15, p. 43-55, 2018.
- BÖCKLE, B.; GALUNSKY, B.; MÜLLER, R. **Characterization of a keratinolytic serine proteinase from Streptomyces pactum DSM 40530.** Applied and environmental microbiology, v. 61, n. 10, p. 3705-3710, 1995.
- BODE, W.; GOMIS-RÜTH, F.; STÖCKLER, W. **Astacins, serralytins, snake venom and matrix metalloproteinases exhibit identical zinc-binding environments (HEXXHXXGXXH and Met-turn) and topologies and should be grouped into a common family, the 'metzincins'.** FEBS Letters, v. 331, n. 1-2, p. 134-140, 1993.
- BORZANI, W. et al. **Biotecnologia industrial.** 1. ed. São Paulo: EdgardBlücher, 2001. p.508-511.
- CARTA, G.; JUNGBAUER, A. **Protein chromatography.** 1. ed. Weinheim: Wiley-VCH, 2010.
- COSTA-JUNIOR, R. et al. **Ultrasound-Assisted Enzyme-Catalyzed Hydrolysis of Collagen to Produce Peptides With Biomedical Potential: Collagenase From**

Aspergillus terreus UCP1276. Bioelectromagnetics, v. 41, n. 2, p. 113-120, 2019.

CHEW, K.; LING, T.; SHOW, P. **Recent Developments and Applications of Three-Phase Partitioning for the Recovery of Proteins.** Separation & Purification Reviews, v. 48, n. 1, p. 52-64, 2018.

DANTAS, J. M. M. **Purificação de quitosanas produzidas por Bacillus cereus utilizando cromatografia líquida rápida de proteínas.** 2017. 34 f. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Engenharia Química), Departamento de Engenharia Química, Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal, 2017.

FELICIAN, F. et al. **The wound healing potential of collagen peptides derived from the jellyfish *Rhopilema esculentum*.** Chinese Journal of Traumatology, v. 22, n. 1, p. 12-20, 2019.

FU, C. et al. **Creating efficient novel aqueous two-phase systems: Salting-out effect and high solubility of salt.** Fluid Phase Equilibria, v. 490, p. 77-85, 2019.

GAGAOUA, M.; HAFID, K. **Three Phase Partitioning System, an Emerging Non-Chromatographic Tool for Proteolytic Enzymes Recovery and Purification.** Biosensors Journal, v. 5, n. 1, 2016.

HAYET, B. et al. **Low molecular weight serine protease from the viscera of sardinelle (*Sardinella aurita*) with collagenolytic activity: Purification and characterisation.** Food Chemistry, v. 124, n. 3, p. 788-794, 2011.

IQBAL, M. et al. **Aqueous two-phase system (ATPS): an overview and advances in its applications.** Biological Procedures Online, v. 18, n. 1, 2016.

JÖNSSON, Malin; JOHANSSON, Hans-Olof. **Protein partitioning in thermoseparating systems of a charged hydrophobically modified ethylene oxide polymer.** Journal of Chromatography A, v. 983, n. 1-2, p. 133-144, 2003

KETNAWA, S. et al. **Three-phase partitioning and proteins hydrolysis patterns of alkaline proteases derived from fish viscera.** Separation and Purification Technology, v. 132, p. 174-181, 2014.

KUMAR, A. et al. **Marine collagen peptide as a fortificant for biscuit: Effects on biscuit attributes.** LWT, v. 109, p. 450-456, 2019.

LI, P. et al. **Extraction and characterization of collagen from sea cucumber**

(Holothuriacinerascens) and its potential application in moisturizing cosmetics. Aquaculture, v. 515, p. 734590, 2020.

LIMA, L.K.F. **Reaproveitamento de resíduos sólidos na cadeia agroindustrial do pescado.** Palmas: Embrapa Pesca e Aquicultura, 2013. 28p.

LIU, Z. et al. **Three-Phase Partitioning for the Extraction and Purification of Polysaccharides from the Immunomodulatory Medicinal Mushroom Inonotus obliquus.** Molecules, v. 24, n. 3, p. 403, 2019.

MAZZOLA, P. et al. **Liquid-liquid extraction of biomolecules: an overview and update of the main techniques.** Journal of Chemical Technology & Biotechnology, v. 83, n. 2, p. 143-157, 2008.

NAZZARO, F. et al. **Recovery of biomolecules of high benefit from food waste.** Current Opinion in Food Science, v. 22, p. 43-54, 2018.

NOVÁK, P.; HAVLÍČEK, V. **Protein Extraction and Precipitation.** Proteomic Profiling and Analytical Chemistry, p. 51-62, 2016.

OLIVEIRA, V. M. et al. **Crosslink-free collagen from Cichlaocellaris: Structural characterization by FT-IR spectroscopy and densitometric evaluation.** Journal of Molecular Structure, v.1176, p.751-758, 2019.

OLIVEIRA, V. M. et al. **Colágeno: características gerais e produção de peptídeos bioativos - uma revisão com ênfase nos subprodutos do pescado.** Acta of Fisheries and Aquatic Resources, v. 5, n. 2, p. 56-68, 2017.

OLIVEIRA, V. M. et al. **Separation and partial purification of collagenolytic protease from peacock bass (Cichlaocellaris) using different protocol: Precipitation and partitioning approaches.** Biocatalysis and Agricultural Biotechnology, p. 101509, 2020.

PESSOA JÚNIOR, A.; KILIKIAN, B. **Purificação de Produtos Biotecnológicos.** In: BORZANI, W. Biotecnologia Industrial. Tradução . 1. ed. [s.l.] Edgard Blücher, 2001. p.493-507.

PESSOA JÚNIOR, A.; KILIKIAN, B. **Purificação de produtos biotecnológicos.** Barueri: Manole, 2005.

RAWDKUEN, S.; VANABUN, A.; BENJAKUL, S. **Recovery of proteases from the**

viscera of farmed giant catfish (*Pangasianodon gigas*) by three-phase partitioning. *Process Biochemistry*, v. 47, n. 12, p. 2566-2569, 2012.

SANKARAN, R. et al. **Recent advances of aqueous two-phase flotation system for the recovery of biomolecules.** *Fluid Phase Equilibria*, v. 501, p. 112271, 2019.

SAKHAROV, I. et al. **Substrate specificity of collagenolytic proteases from the king crab *Paralithodes camtschatica*.** *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Comparative Biochemistry*, v. 107, n. 3, p. 411-417, 1994.

SILVA, L.; LOH, W. **Sistemas aquosos bifásicos: fundamentos e aplicações para partição/purificação de proteínas.** *Química Nova*, v. 29, n. 6, p. 1345-1351, 2006.

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

STÖCKER, Walter; BODE, Wolfram. **Structural features of a superfamily of zinc-endopeptidases: the metzincins.** *Current opinion in structural biology*, v. 5, n. 3, p. 383-390, 1995

WANDERLEY, M. C. A. et al. **Purification and characterization of a collagenase from *Penicillium* sp. UCP 1286 by polyethylene glycol-phosphate aqueous two-phase system.** *Protein Expression and Purification*, v. 100, n. 133, p. 8-14, 2017

YOSHINAKA, R.; SATO, M.; IKEDA, S. **Distribution of collagenase in the digestive organs of some teleosts.** *NIPPON SUISAN GAKKAISHI*, v. 44, n. 3, p. 263-267, 1978.

ZHU, L. et al. **Porcine bone collagen peptides promote osteoblast proliferation and differentiation by activating the PI3K/Akt signaling pathway.** *Journal of Functional Foods*, v. 64, p. 103697, 2020.