

INSTITUTO NACIONAL DE PESQUISAS DA AMAZÔNIA – INPA

UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS - UFAM

SELEÇÃO DE PROTEASES BACTERIANAS PARA A REMOÇÃO DAS ESCAMAS DO
Colossoma macropomum (Cuvier, 1818) DE PISCICULTURA DA REGIÃO AMAZÔNICA

ELTON NUNES BRITTO

Manaus, Amazonas

Janeiro, 2008

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

INSTITUTO NACIONAL DE PESQUISAS DA AMAZÔNIA – INPA
UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS - UFAM

SELEÇÃO DE PROTEASES BACTERIANAS PARA A REMOÇÃO DAS ESCAMAS DO
Colossoma macropomum (Cuvier, 1818) DE PISCICULTURA DA REGIÃO AMAZÔNICA

ELTON NUNES BRITTO
JOSÉ CELSO DE OLIVEIRA MALTA, Dr.
ROGÉRIO SOUZA DE JESUS, Dr.

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Biologia Tropical e Recursos Naturais do Convênio **INPA/UFAM**, como parte dos pré-requisitos para obtenção do título de Doutor em **CIÊNCIAS BIOLÓGICAS**, área de concentração em Biologia de Água Doce e Pesca Interior.

Manaus - AM

Janeiro- 2008

FICHA CATALOGRÁFICA

Britto, Elton Nunes

SELEÇÃO DE PROTEASES BACTERIANAS PARA A REMOÇÃO DAS ESCAMAS DO
Colossoma macropomum (Cuvier, 1818) DE PISCICULTURA DA REGIÃO AMAZÔNICA/

Elton Nunes Britto – 2008.

62 f.

Tese (Doutorado) – INPA/UFAM, Manaus, 2008.

1. tambaqui. 2. proteases. 3. bactérias. 3. remoção de escamas. 4. couro. 5. extrato bruto. 6. Amazônia. 7. Brasil

Sinopse:

Estudou-se o uso de extrato bruto enzimático para a remoção de escamas da pele do tambaqui, *Colossoma macropomum* de criações de peixes do Estado do Amazonas. Isolamento de bactérias do trato gastrointestinal do tambaqui, caracterização de proteases e etapa do caleiro de couro foram avaliados.

Palavras-chave: tambaqui, proteases, bactéria, remoção de escamas, couro, extrato bruto, Amazônia, Brasil.

Keywords: tambaqui, proteases, bacteria, removal of scales, leather, crude extract, Amazonian, Brazil.

DEDICATÓRIA

A Deus que iluminou e que ilumina meu caminho durante toda trajetória da minha vida dando-me vida, saúde e vontade de vencer.

Aos meus pais: Clenea Maria Nunes Britto e Leovegildo Werlayni Leite Britto que me ajudaram dando-me educação, e principalmente a minha mãe por ser minha grande incentivadora, estar sempre a meu lado, nunca medir esforços para proporcionar todo e qualquer tipo de ajuda para eu atingisse este objetivo de vida.

A minha esposa Jane de Souza Nagaoka, cúmplice e companheira de todas as horas e a mulher que eu escolhi para viver.

E a Dra. Judith Cortesão (*in memoriam*) amiga que sempre me incentivou, acreditou em mim durante a graduação em Rio Grande e ofereceu a primeira oportunidade de sair do meu estado para me aventurar neste grande país, viagem que depois que eu fiz me oportunizou a escolha de novos horizontes na minha jornada até conseguir chegar ao doutorado.

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador Dr. José Celso de Oliveira Malta por “sempre” me apoiar em todas as minhas idéias mostrando-me em cada situação em que eu me encontrava com dificuldade que existe o caminho para resolvê-la com calma, serenidade e tato no lidar com o próximo, eu agradeço muito a ele estes ensinamentos que aprendi durante a nossa saudável convivência no decorrer destes quatro anos de doutorado e que guardarei ao longo de minha vida.

Ao meu co-orientador Dr. Rogério Souza de Jesus por me apoiar neste projeto de Doutorado dando sempre suas críticas construtivas para que eu amplie-se meus conhecimentos.

A Dra. Maria Francisca Simas Teixeira onde desenvolvi meu trabalho de doutorado pelos ensinamentos que aprendi, trabalhos que tive a chance de participar, discussões científicas que tivemos sempre de forma humilde, espírito de grupo, boa convivência, e como pessoa pela sua simplicidade de encarar a vida, grande vontade de aprender, dedicação sempre visando ajudar e cooperar intensamente com a formação profissional dos seus alunos.

Ao Dr. Takeshi Matsuura pelo apoio mostrando sempre solidariedade e paciência, e pela boa convivência e discussões científicas que tivemos.

A Dra. Jerusa Andrade e ao Souza pelo apoio nas análises eletroforéticas que necessitei realizar nos experimentos finais.

Ao Dr. Fernando Marques do laboratório de Histologia da Universidade Federal do Amazonas pelo apoio, discussões científicas e a boa convivência.

A Dra. Saete da FIOCRUZ por me ajudar a identificar a bactéria do meu trabalho de doutorado.

Aos colegas do laboratório de Parasitologia: Ana Lucia Gomes da Silva, Carlos Lemos, Márcia Simões, ao Edilson, seu Lito pessoas que eu convivi e que me ajudaram de forma direta e indireta para que pudesse prosseguir.

Aos Colegas do laboratório de Micologia: Memé, Tereza, Herlon, Josi, Michel, pela boa convivência e profissionalismo.

Aos colegas da coordenação de Pesquisas em Tecnologia de Alimentos: ao Dr. Edson Lessi, Dr. Falcão, Dr. Nilson, Dr. Fabio Moroni, Dra. Denise, aos alunos Emanuel, Meire, Viviane Fernandes, Sabá, Ribamar e Mariluce a todos eu agradeço pela boa convivência, e cooperação em todos os momentos que eu precisei.

Ao seu José Rebello por me propiciar os ensinamentos sobre o curtimento de pele, boa convivência, experimentos que desenvolvemos e pelas nossas discussões técnicas.

Aos professores do curso de Pós-graduação em Biologia de Água Doce e Pesca Interior.

A Carminha Arruda sempre a disposição para me ajudar durante o mestrado e o doutorado.

Ao amigo Ricardo Gatto Umpierre, que sempre me ajudou desde o momento que cheguei em Manaus, pela estadia, boa convivência e boa amizade.

Ao CNPq pela bolsa de doutorado sem a qual não conseguiria me manter neste doutorado, bem como aos projetos PPI do INPA.

E a todos aqueles que me ajudaram de forma direta e indireta para eu conseguir desenvolver esta tese, o meu muito obrigado.

RESUMO

O tambaqui (*Colossoma macropomum*) pertence à família Serrasalminidae podendo alcançar mais de 1m de comprimento total. Tem alto valor comercial e é muito apreciado pela população da Amazônia e é criado de forma intensiva e extensiva. Na região Amazônica tem sua pele utilizada para a transformação em couro podendo ser utilizada na confecção de bolsas, calçados e cintos. O objetivo do presente trabalho foi testar o uso de extrato bruto enzimático bacteriano na degradação do colágeno obtido da pele do tambaqui verificando-se sua eficiência durante o curtimento da pele. O estudo iniciou-se pelo isolamento da microbiota bacteriana proteolítica do trato gastrintestinal. Posteriormente foi extraída a gelatina da pele determinando-se suas características físico-químicas. Foi realizada uma seleção pela atividade enzimática testando-se paralelamente o potencial de degradação da gelatina com agar gelatina leite preparado com gelatina comercial e o mesmo agar preparado com gelatina obtida a partir da pele do tambaqui. Foram escolhidos os isolados com os maiores halos de inibição obtidos com agar gelatina leite preparado com gelatina comercial. Posteriormente foi identificado o isolado com maior atividade proteolítica e colagenolítica a *Chryseomonas luteola*. Com o extrato bruto da bactéria *C. luteola* foram desenvolvidos os estudos para a caracterização das proteases e determinação do efeito do extrato bruto na etapa da remoção de escamas durante a fase preparatória para o curtimento. No estudo da caracterização das proteases foi verificado que a protease do extrato bruto obteve pH e temperatura ótimos de 7,2 e 70°C a 80°C. A atividade relativa foi 117% respectivamente, enquanto que a atividade residual a 70°C foi de 166% sofrendo uma redução em 80°C para 26% durante 90 minutos de incubação. Foi verificado o efeito do tempo e agitação no tratamento dos fragmentos de pele de tambaqui pelo extrato bruto testado a 25°C nos tempos de 1h, 2h e 3h. Os resultados indicaram que houve diferença significativa quanto à condição de agitação ($p=0,000$) e tempo de incubação ($p=0,001$) optando-se pelo tratamento sem agitação devido ao tipo de sistema de curtimento utilizado ser, sem agitação, e o tempo de 1h por ter o maior valor de atividade enzimática do extrato bruto. A avaliação sensorial realizada nos fragmentos de pele de tambaqui em 1h indicou que 83,33% dos julgadores os consideraram flexíveis ao retirar a escama com a colher no tratamento sem agitação. No efeito

do extrato bruto enzimático de *C. luteola* produzido a 40°C e testado a 25 °C em fragmentos de pele foi escolhido o tratamento (1:10), de extrato bruto e água destilada, e as análises sensoriais indicaram que 67% dos julgadores atribuíram à nota D e 33,33% a nota B. As análises histológicas indicaram que o extrato bruto no tratamento (1:10) produziu alterações na arquitetura das fibras colágenas semelhantes àquelas alterações produzidas pela papaína a 0,02%. E, foi verificado que o extrato bruto preparado no tratamento (1:10) sobre as peles inteiras removeu com certa facilidade as escamas da pele em 1h de exposição e com facilidade em 2h de exposição.

ABSTRACT

The tambaqui *Colossoma macropomum* belongs to the family Serrasalminidae could reach more than 1m of total length. It has high commercial value and it is very appreciated by the population of the Amazonian. It is created in an intensive and extensive way. In the Amazonian area your skin used for the transformation in leather could be used in the making of bags, shoes and belts. The objective of the present work was to test the use of enzymatic crude extract bacterial in the degradation of the obtained collagen of the skin of the tambaqui being verified sweats efficiency during the tanning of the skin. For so much the study began for the isolation of the proteolytic bacterial microbiota from the digestive tract of the tambaqui. Later it was extracted the gelatin of the skin of the tambaqui being determined their physicochemical characteristics. A selection was accomplished by the enzymatic activity being tested the potential of degradation of the gelatin parallel with agar gelatin milk prepared with commercial gelatin and the same agar prepared with gelatin obtained starting from the skin of the tambaqui. They were chosen the isolated ones with the largest inhibition halos obtained with agar gelatin milk prepared with commercial gelatin. Later it was identified the isolated with larger proteolytic and collagenolytic activity of the *Chryseomonas luteola*. With the crude extract of the bacteria *C. luteola* the studies were developed for the characterization of the proteases and determination of the effect of the crude extract in the stage of the removal of scales during the preparatory phase for the tanning. In the study of the characterization of the proteases it was verified that the protease of the crude extract obtained pH and temperature great of 7.2 and 70°C to 80°C. The relative activity was 117% respectively, while the residual activity to 70°C was of 166% suffering a reduction in 80°C for 26% for 90 minutes of incubation. It was verified the effect of the time and agitation in the treatment of the fragments of tambaqui skin for the crude extract tested to 25°C in the times of 1 hour, 2 hour and 3 hours. The results indicated that there was significant difference as for the agitation condition ($p=0.000$) and time of incubation ($p=0.001$) being opted for the treatment without agitation due to the type of system of used tanning to be, without agitation, and the time of 1 hour for having the largest value of enzymatic activity of the crude extract. Sensorial evaluation accomplished in the fragments of tambaqui skin in 1hour indicated that 83.33 % of

the judges considered the flexible skin fragments when removing the scale with the spoon in the treatment without agitation. In the effect of the enzymatic crude extract of *C. luteola* produced to 40°C and tested 25°C in fragments of tambaqui skin was chosen the treatment (1:10), of crude extract and distilled water, and the sensorial analyses indicated that 67 % of the judges attributed the note D and 33.33 % the note B. The histological analyses indicated that the crude extract in the treatment (1:10) it produced alterations in the architecture of the fibers similar collagens those alterations produced by the papain to 0.02 %. And it was verified that the prepared crude extract in the treatment (1:10) on the whole skins it removed with certain easiness the scales of the skin in 1 hour of exhibition and with easiness in 2 hours of exhibition.

SUMÁRIO

2. INTRODUÇÃO	1
2.1-Tambaqui <i>Colossoma macropomum</i>	1
2.2 - O Colágeno	4
2.3 - A Gelatina	4
2.4 - Processamento de couro	5
2.5 - Importância do couro de peixes	6
2.6 - Potencial do couro de peixe para utilização na indústria calçadista e vestuário	7
2.7 - Proteases microbianas na indústria do couro	10
3. JUSTIFICATIVA	11
4- OBJETIVOS	12
4.1 - Objetivo geral	12
4.1.1- Objetivos específicos	12
4.2 – Pergunta	12
4.2.1 – Hipóteses	12
5. MATERIAL E MÉTODOS	13
5.1 – Material	13
5.2 – Metodologia	13
5.2.1 – Isolamento das bactérias proteolíticas	13
5.2.2 - Determinação da composição química centesimal das peles	14
5.2.3 - Extração da gelatina da pele do tambaqui	15
5.2.4 - Obtenção do extrato bruto enzimático	15
5.2.4.1 - Detecção da atividade enzimática do extrato bruto	16
5.2.4.2 - Determinação da atividade proteolítica	17
5.3 - Teste da degradação do colágeno	17
5.4 - Identificação das bactérias proteolíticas	17
5.5 - Obtenção do inóculo para a construção da curva de crescimento	18
5.6 - Caracterização das proteases	18
5.7 – Efeito do tempo e agitação no tratamento dos fragmentos de pele de tambaqui pelo extrato bruto testado a 25°C.	19
5.8 - Efeito da concentração da enzima do extrato bruto	20
5.8.1 - Análise histológica dos fragmentos de pele que sofreram a ação do extrato bruto para a remoção das escamas	20
5.9 - Efeito do extrato bruto para verificar a remoção das escamas	21

das peles inteiras de tambaqui e avaliação sensorial

6. RESULTADOS	22
6.1 – Seleção dos isolados produtores de proteases do trato gastrintestinal do tambaqui	22
6.1.1 - Composição química centesimal da gelatina	25
6.2 - Identificação dos isolados	28
6.3 – Características da protease do extrato bruto obtida de <i>C. luteola</i>	29
6.3.1 - Efeito da temperatura e pH na atividade proteolítica	29
6.3.2 - O efeito da temperatura e pH na estabilidade da atividade proteolítica	30
6.4 - Seleção da temperatura ótima de crescimento da <i>C. luteola</i> e atividade proteolítica da protease do extrato bruto	32
6.4.1 - Efeito do tempo e agitação no tratamento dos fragmentos de pele de tambaqui pelo extrato bruto testado a 25°C.	34
6.4.1.1 - Avaliação sensorial realizada nos fragmentos de pele de tambaqui nos tempos de 1h, 2h e 3h.	35
6.4.2 - Teste do efeito do extrato bruto enzimático de <i>C.luteola</i> produzido a 40°C e testado a 25 °C em fragmentos de pele de tambaqui para verificar a remoção das escamas	37
6.4.2.1 - Dosagem de proteínas totais do extrato bruto de <i>C. Luteola</i>	37
6.4.2.2 – Determinação da atividade enzimática quantitativa do extrato bruto de <i>C. luteola</i> em 1h	38
6.4.3 – Determinação da atividade específica enzimática quantitativa do extrato bruto de <i>C. luteola</i> em 1h	38
6.4.3.1 - Avaliação sensorial do extrato bruto de <i>C. luteola</i> em 1h	39
6.4.3.1.1 - Avaliação da nota D atribuída pelos julgadores em comparação com a atividade enzimática do extrato bruto de <i>C. luteola</i> em 1h	40
6.5 - Análises histológicas dos fragmentos de pele	41
6.5.1 - Efeito da protease do extrato bruto de <i>C.luteola</i> produzido a 40 °C e testado a 25 °C	43
6.5.1.1 - Dosagem de proteínas totais do extrato bruto de <i>C. Luteola</i>	43
6.5.1.2 – Avaliação sensorial das peles inteiras de tambaqui sobre ação do extrato bruto de <i>C. Luteola</i>	45
7- DISCUSSÃO	46
7.1 – Seleção dos isolados pela determinação da atividade proteolítica qualitativa	46

7.2 – Extração e caracterização físico-química da gelatina da pele do tabaqui	46
7.3 – Seleção dos isolados pela atividade proteolítica quantitativa	47
7.4 – Seleção dos isolados pela atividade colagenolítica qualitativa	48
7.5 - Identificação dos isolados	48
7.5.1 - <i>Chryseomonas luteola</i>	48
7.5.2 - <i>Brevundimonas vesiculares</i>	49
7.6 – Características cinéticas do extrato bruto enzimático de <i>C. luteola</i>	50
7.7 - Experimentos finais: testes com o extrato bruto	53
7.7.1 - Seleção do tratamento com e sem agitação a partir do extrato bruto de <i>C. luteola</i> produzido a 25 °C e aplicado no caleiro a 25°C	53
7.7.1.1 - Avaliação sensorial	54
7.7.1.2 – Experimento do efeito do extrato bruto de <i>C.luteola</i> produzido a 40°C e testado a 25 °C sobre pedaços de pele de tabaqui para verificar a remoção das escamas	54
7.7.1.2.1 - Avaliação sensorial do extrato bruto produzido a 40°C e testado a 25 °C, em 1h sem agitação	55
7.8 - Análises histológicas dos fragmentos de pele com extrato bruto produzido a 40°C e testado a 25 °C, em 1h sem agitação	57
8. CONCLUSÃO	58
9. BIBLIOGRAFIA CITADA	62

LISTA DE FIGURAS

- FIGURA 1.** Seleção dos isolados proteolíticos reinoculados em ágar gelatina peixe com diâmetro dos halos variando de 11,7mm até 24,7mm. 22
- FIGURA 2.** Seleção dos isolados proteolíticos reinoculados em ágar gelatina leite com diâmetro dos halos variando de 20mm até 25,7mm. 22
- FIGURA 3.** Seleção dos 65 isolados pela atividade proteolítica em azocazeína 1% preparada em tampão Tris-Hcl pH 7,2 em 1h a 37°C e medida a 440 nm. 23
- FIGURA 4.** Halos de atividade colagenolítica positiva do extrato bruto do isolado numero 1 em agar colágeno leite (ACL) incubado a 37°C por 24h. 24
- FIGURA 5.** Efeito do pH na atividade proteolítica medido em diferentes tampões: pH 6,0-8,0 tampão Fosfato 0,1M e pH 9,0-10,0 tampão carbonato-bicarbonato de sódio 0,1M com substrato azocaseína 1% incubado a 37°C por 1 hora. 28
- FIGURA 6.** Efeito da temperatura na atividade proteolítica medido em diferentes temperaturas de 25°C – 80°C com substrato azocaseína 1% incubado a 37°C por 1 hora. 28
- FIGURA 7.** Efeito do pH na atividade (Δ) e estabilidade (\blacktriangle) da protease medido em diferentes tampões: pH 6,0-8,0 tampão Fosfato 0,1M e pH 9,0-10,0 tampão carbonato-bicarbonato de sódio 0,1M com substrato azocaseína 1% incubado a 37°C por 1 hora em 90 minutos, em duplicata, medido a 440 nm. 29
- FIGURA 8.** Efeito da temperatura na atividade (Δ) e estabilidade (\blacktriangle) da protease medido em diferentes temperaturas de 25°C – 80°C com substrato azocaseína 1% preparado em pH 8,0 incubado por 1 hora em 90 minutos, em duplicata. 30
- FIGURA 9.** Crescimento de *C. luteola* (\blacksquare) obtido de um inoculo escala Macfarland 1 em shaker por 24h a 37°C medido a 660nm. Atividade proteolítica da protease do extrato bruto de *C. luteola* (\square) produzido em shaker por 24h a 37°C e determinada em substrato azocazeína 1% em 1h. 30
- FIGURA 10.** Crescimento de *C. luteola* obtido de um inoculo escala Macfarland 1 nas condições 150rpm por 24h nas temperaturas de 25°C a 50°C medido a 660nm. 31
- FIGURA 11.** Atividade proteolítica de *C. luteola* obtido do extrato bruto a partir de um inóculo escala Macfarland 1 que cresceu nas condições 150rpm por 24h nas temperaturas de 25°C a 50°C determinado com o substrato azocazeína 1% preparada em pH 7,6 em 1h e medido a 440nm. 32
- FIGURA 12.** Avaliação da análise sensorial dos fragmentos de pele tambaqui submetidos aos tratamentos: CN = controle negativo; S = sem agitação por 1h; C = com agitação a 150rpm por 1h. A nota atribuída aos fragmentos foi: A = ao raspar com a 33

colher apresenta resistência; B = ao raspar com a colher apresenta mais resistência; C = ao raspar com a colher apresenta-se flexível.

FIGURA 13. Avaliação da análise sensorial dos fragmentos de pele tabaqui 34 submetidos aos tratamentos: CN = controle negativo; S = sem agitação por 2h; C = com agitação a 150rpm por 2h. A nota atribuída aos fragmentos foi: A = ao raspar com a colher apresenta resistência; B = ao raspar com a colher apresenta mais resistência; C=ao raspar com a colher apresenta-se flexível.

FIGURA 14. Avaliação da análise sensorial dos fragmentos de pele tabaqui 35 submetidos aos tratamentos: CN = controle negativo; S = sem agitação por 3h; C = com agitação a 150rpm por 3h. A nota atribuída aos fragmentos foi: A = ao raspar com a colher apresenta resistência; B = ao raspar com a colher apresenta mais resistência; C=ao raspar com a colher apresenta-se flexível.

FIGURA 15. Valores de atividade enzimática do extrato bruto produzido a 40°C e 36 testado a 25 °C na condição sem agitação. Os tratamentos são: CP = papaína em tampão Tris-HcL pH 7,6; 1 = (1:1) de extrato bruto: água destilada, sendo (14mL: 14 mL); 2 = (1:10) e 3 = (1:100).

FIGURA 16. Avaliação sensorial sobre os fragmentos de pele de tabaqui que 37 sofreram ação do extrato bruto durante 1h produzido a 40°C e testado a 25°C na condição sem agitação. Os tratamentos são: CN = água destilada (14mL); CP = papaína em tampão Tris-HcL pH 7,6; 1 = (1:1) de extrato bruto : água destilada, sendo (14 mL: 14 mL); 2 = (1:10) e 3 = (1:100). A nota atribuída aos fragmentos foi: A = ao raspar com a colher a escama sai com dificuldade; B = ao raspar com a colher a escama sai com pouca dificuldade; C = ao raspar com a colher a escama sai com uma certa facilidade; e D = ao raspar com a colher a escama sai com facilidade.

FIGURA 17. Comparativo da avaliação sensorial (□) e atividade proteolítica (■) sobre 38 os fragmentos de pele de tabaqui que sofreram ação do extrato bruto produzido a 40°C e testado a 25°C na condição sem agitação durante 1h. Os tratamentos são: CN = água destilada (14mL); CP = papaína em tampão Tris-HcL pH 7,6; 1 = (1:1) de extrato bruto: água destilada, sendo (14mL: 14mL); 2 = (1:10) e 3 = (1:100). A nota D = ao raspar com a colher a escama sai com facilidade.

FIGURA 18. Histologia dos cortes dos fragmentos de peles coradas com Hematoxilina 39 e eosina. A = controle negativo, tecido normal (40 x), fibras colágenas transversais (►) ; B = controle positivo solução de 0,02% papaína (40x), ação da papaína sobre as fibras do tecido conjuntivo (▼); C = tratamento 2, ação do extrato bruto sobre as fibras do tecido conjuntivo (▼) (40 x); D = tratamento 2, ação do extrato bruto sobre as fibras do tecido conjuntivo (◄) (40 x).

FIGURA 19. Histologia dos fragmentos coloração para tecido conjuntivo com 40 Tricrômico de Masson. A = controle negativo com água destilada (▼fibras colágenas do tabaqui intactas) (40x); B = controle positivo com solução de papaína 0,02% preparada em tampão Tris-HCl pH 7,6 (►espaços deixados entre as fibras colágenas do tabaqui pela ação da papaína) (40x); C = tratamento 2 (1:10)/extrato bruto enzimático: água destilada (◄ espaços deixados nas fibras colágenas do tabaqui pela ação do extrato bruto enzimático de *C. luteola*) (40x).

FIGURA 20. Avaliação sensorial das peles de tabaqui sob ação do extrato bruto de *C. luteola* produzido nas condições (40°C, 150rpm, 24h) e testado a 25°C, nos tratamentos: CN = controle negativo (água destilada); CP = controle positivo (solução de papaína a 0,02% preparada tampão Tris-HCl em pH 7,6); tratamento 2 = (1:10), extrato bruto: água destilada durante 1h. Pontuação atribuída: A = ao raspar com a colher a escama sai com dificuldade; B = ao raspar com a colher a escama sai com pouca dificuldade; C = ao raspar com a colher a escama sai com uma certa facilidade; e D = ao raspar com a colher a escama sai com facilidade. 42

FIGURA 21. Avaliação sensorial das peles de tabaqui sob ação do extrato bruto de *C. luteola* produzido nas condições (40°C, 150rpm, 24h) e testado a 25°C, nos tratamentos: CN = controle negativo (água destilada); CP = controle positivo (solução de papaína a 0,02% preparada tampão Tris-HCl em pH 7,6); tratamento 2 = (1:10), extrato bruto: água destilada durante 2h. Pontuação atribuída: A = ao raspar com a colher a escama sai com dificuldade; B = ao raspar com a colher a escama sai com pouca dificuldade; C = ao raspar com a colher a escama sai com uma certa facilidade; e D = ao raspar com a colher a escama sai com facilidade. 42

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1.** Composição química centesimal da gelatina obtida a partir da pele do tambaqui proveniente de criações em Manaus – Estado do Amazonas. 21
- Tabela 2.** Características bioquímicas da bactéria *Chryseomonas luteola* conforme o Kit API 20 NE. 26
- Tabela 3.** Características bioquímicas da bactéria *Brevundimonas vesiculares* conforme os resultados do Kit API 20 NE. 27
- Tabela 4.** Peso (g) dos fragmentos de pele de 6cm² (3cm largura x 2cm comprimento) do tambaqui *C. macropomum*. 35
- Tabela 5.** Valores de proteínas totais, atividade enzimática, atividade específica e rendimento. 37

1 INTRODUÇÃO

1.1 Tambaqui *Colossoma macropomum*

O tambaqui *Colossoma macropomum* (Cuvier, 1818) pertence à família Serrasalmidae podendo alcançar mais de 1m de comprimento total. Ocorre no Brasil, Venezuela, Colômbia, Peru e Bolívia. A forma do corpo é romboidal e possui duas fileiras de dentes robustos e molariformes na maxila superior. Na maxila inferior possui uma fileira de dentes robustos decrescendo em tamanho a partir do par de dentes centrais, sendo que atrás do par de dentes centrais há um par de dentes cônicos. A nadadeira adiposa é curta com raios na extremidade. Tem longos e numerosos rastros branquiais (Araujo-Lima & Goulding, 1998).

Na natureza é onívoro, alimentando-se de frutos, sementes e zooplâncton. Tem alta fecundidade, maturidade sexual tardia, alto investimento energético no crescimento e baixo investimento energético na reprodução. A estratégia reprodutiva é sazonal, adaptando-se às mudanças do nível do rio e do regime anual de chuvas. A maturação gonadal inicia no pico do período de seca próximo a outubro, e a desova coincide com o período das chuvas podendo se estender até março (Araujo-Lima & Goulding 1998).

Tem alto valor comercial e é muito apreciado pela população da Amazônia. Nas criações aceita bem ração, grãos e subprodutos agroindustriais e tolera baixos teores de oxigênio dissolvido na água. É criado de forma intensiva e extensiva. A criação intensiva tem sido feita em tanques de alvenaria, represas de igarapés e em tanques-rede. Os tanques de alvenaria são usados na criação experimental e na larvicultura. As represas de igarapés para a produção natural de zooplâncton e de juvenis, os quais são mantidos nas densidades de 2 a 5 indivíduos/m² (Araujo-Lima & Goulding, 1998).

Cardoso (2000) pesquisou a forma de produção de peixes em cativeiros nos principais municípios do Estado do Amazonas, como Manacapuru, Rio Preto da Eva e Iranduba e em Manaus. Ele verificou um universo amostral de 21 piscicultores e constatou

que 95% utilizavam o sistema semi-intensivo caracterizado por viveiros de barragem em igarapés de terra-firme, com controle de entrada e saída de água, fornecimento de ração própria para peixes e alimentos alternativos. Também que 87,5% utilizavam o policultivo e que o *C. macropomum* é a espécie dominante em 95,2% das espécies amostradas.

Maeda *et al.* (2000) estudaram os sistemas de produção de criadores de peixes de Manaus e dos municípios de Presidente Figueiredo, Itacoatiara, Rio Preto da Eva, Manacapuru e Iranduba. Entrevistaram 37 piscicultores e constataram que o município de Rio Preto da Eva possui o grupo de piscicultura mais antigo, onde 68% dos piscicultores iniciaram visando lucros, e que nenhum exerce exclusivamente a piscicultura, tendo outras atividades rurais e empresariais nas cidades, sendo a piscicultura uma atividade alternativa. E nesta atividade de criar, o tambaqui é a espécie preferida pelo valor comercial e pela disponibilidade de juvenis. A criação do tambaqui é realizada por 89,18% dos piscicultores, sendo que destes: 32,4% realizam monocultivo, 16,2% bicultivo com curimatã *Prochilodus nigricans* Spix & Agassiz, 1829, ou com quelônios, ou *Semaprochilodus* spp. (jaraquis) ou ainda com carpas; e 43,2% no policultivo com jaraquis, matrinxã, tilápias e carpa.

De acordo com Cardoso (2000) o tambaqui na Amazônia é comercializado em ordem de preferência, como: *in natura* na beira dos viveiros; inteiro resfriado ou congelado; vivo e eviscerado. O destino comercial é 47,6% para as feiras e 33,33% para os supermercados, não havendo registro de comercialização para frigoríficos. Quanto à avaliação da qualidade do tambaqui em Manaus de acordo com Almeida (1998) o tambaqui inteiro resfriado, entre camadas de gelo, pode permanecer apto para o consumo por 43 dias e segundo Lessi *et al.* (2000) pode ser comercializado tanto no mercado nacional como internacional.

Silva (2001) estudou a flora de bactérias gram-negativas presentes em tambaquis de piscicultura provenientes de duas estações e de dois produtores da Amazônia. A primeira amostra foi com juvenis produzidos nas estações. A primeira estação situada à jusante da

barragem da hidroelétrica de Balbina, no município de Presidente Figueiredo, e a segunda no município de Itacoatiara. Peixes com cerca de seis meses foram obtidos de dois produtores. Os peixes do produtor A eram da estação de Balbina e foram criados intensivamente, em tanques com alta densidade de estocagem. Os peixes do produtor B eram da estação de Itacoatiara e foram criados semi-intensivamente em represas com baixa densidade de estocagem.

Amostras de brânquias e fígado foram retiradas e culturas foram feitas. O resultado mostrou a presença de 20 espécies de bactérias gram-negativas. Nas amostras das brânquias dos tambaquis da estação de Balbina, 23,33% estavam infectados e de Itacoatiara 60%. Nas do produtor A 93,33% e do produtor B 80%. Nas amostras de fígado dos peixes de Balbina, 10% estavam infectadas, de Itacoatiara 13,33%, do produtor A 20% e do produtor B não ocorreu nenhum registro (Silva, 2001).

Nas amostras da estação de Balbina bactérias do gênero *Flavobacterium* representaram 60% do total das bactérias isoladas. Nas amostras de Itacoatiara bactérias dos gêneros *Alcaligenes*, *Haemophilus*, *Pasteurella* e *Proteus* representaram 25%. Nas amostras dos produtores A e B as bactérias *Flavobacterium* sp. e *Rochalimea henselae* representaram 33,33% respectivamente (Silva, 2001).

Em outros estudos realizados por Pantoja (2000) os resultados indicaram a ocorrência de *Aeromonas hydrophila*, *A. sobria* e *A. caviae* em tambaquis vendidos em supermercados e feiras de Manaus. A presença destas bactérias podem estar relacionadas às más condições de armazenamento, uso de utensílios contaminados e condições higiênico-sanitárias insatisfatórias.

1.2 O Colágeno

O colágeno é uma proteína rica nos aminoácidos glicina e prolina não possuindo o aminoácido triptofano. No seu estado natural, é insolúvel, porém quando extraído por hidrólise enzimática a sua estrutura original é quebrada resultando num produto completamente solúvel em água fria com odor e sabor neutros (Villanueva, 1986). O colágeno pode ser encontrado em todos os tecidos dos organismos multicelulares, como nos: tendões, pele, ossos desmineralizados, cartilagens, ligamentos, músculo, placenta e sistema vascular (Kimura & Kimura, 1982).

Os colágenos compreendem uma grande e diversificada família de proteínas, com características peculiares à configuração tripla helicoidal, possuindo três cadeias polipeptídicas denominadas alfa, onde cada cadeia possui uma trinca repetitiva de aminoácidos Gli-X-Y (Pihlajaniemi & Rohn, 1995). Existem 19 grupos de colágenos reunidos segundo a capacidade de formar fibrilas: os colágenos fibrilares com os tipos I, II, III, VI e XI; àqueles associados às fibrilas com os tipos IX, XII, XIV, XVI e XIX; e àqueles não associados às fibrilas com os tipos IV, VI, VII, VIII, X, XIII, XV, XVII e XVIII (Shimokomaki *et al.*, 1993).

De um modo geral, na pele e no músculo dos pescados, há um predomínio do colágeno do grupo I. Na notocorda da lampreia existe o colágeno do grupo II (Kimura & Kimura, 1982). E, a carpa, a truta e a cavala possuem colágeno do grupo IV (Sato, 1988).

1.3 A Gelatina

A gelatina é o colágeno desnaturado, sem triptofano e rico nos aminoácidos lisina e metionina. No estado natural apresenta-se como gel sem cor e aroma (Brody, 1965). Quando a gelatina é submetida à fervura perde as características geleificantes (Hamm, 1963 *apud* Da Silva, 2004). A gelatina comercial obtida de bovinos e de suínos, quando é extraída do colágeno hidrolisado, em meio alcalino e ácido, origina géis elásticos e termoreversíveis. E

quando misturada a hidrocolóides: como pectina, amido e nos doces como goma arábica, forma géis com diferentes características (Bobbio, 2001).

A gelatina bovina é um alimento protéico, altamente digestivo que pode ser utilizada como complemento para dietas e na área de tecnologia dos alimentos e é utilizada para melhorar a elasticidade, consistência e estabilidade dos alimentos (Johnston-Banks, 1990 *apud* Da Silva, 2004). A gelatina obtida de pescados, como as provenientes da pele do mapará *Hypophthalmus edentatus* Spix & Agassiz, 1829 e da piramutaba *Brachyplatystoma vaillanti* (Valenciennes, 1840) têm teores de aminoácidos de 72,84% e 90%, contêm altos teores de glicina, prolina, arginina e ácido aspártico e, os aminoácidos triptofano e cistina estão ausentes (Da Silva, 2004).

Nessas gelatinas, as composições químicas, para o mapará e para a piramutaba ocorrem em torno de 66% e 68% de proteína, 14% e 14,8% de umidade, 0,3% e 0,4% de lipídeos, 2% e 0,04% de cinzas e 8,8% e 7,7% de carboidratos. Aproximadamente 63% e 81% das proteínas totais da pele do mapará e da piramutaba eram compostas por colágeno (Da Silva, 2004).

1.4 Obtenção de couro de peixe

A pele é constituída por tecido conjuntivo fibroso que é formado por fibras colágenas e elásticas e também pelo tecido adiposo (Rogers, 1953). No processamento de couro, do ponto de vista do curtidor, as fibras colágenas são as proteínas mais importantes, porque reagem com os agentes curtentes (Hoinacki, 1989). Cortando-se transversalmente a pele é possível observar nitidamente duas camadas principais: uma camada superior ou epiderme e outra camada inferior localizada abaixo da epiderme, a derme ou córion, a qual é transformada em couro (Rogers, 1953).

De Barros *et al.* (1998) citaram que o couro é a pele do animal imputrescível pelo processo de curtimento tornando a pele flexível e macia. No curtimento é mantida a natureza

fibrosa da pele, porém as fibras são previamente separadas pela remoção do tecido interfibrilar e pela ação de produtos químicos.

De uma maneira geral, o curtimento das peles divide-se em três etapas: a preparação; o curtimento e o acabamento. Na preparação das peles para o curtimento ocorrem os processos de remolho; depilação no caso da pele de mamíferos; descarne e purga. O remolho serve para hidratar a pele e desprender sujidades e restos de sangue. A depilação para eliminar pelos e provocar um inchamento da derme por agentes químicos, que dilatam as fibras. O descarne é realizado através de máquinas e consiste na separação da carne que está abaixo da derme. E a purga é o processo final da preparação. Esta etapa consiste no uso de enzimas proteolíticas, lipolíticas e amilolíticas com o objetivo de tornar a pele mais suave e macia (Rogers, 1953).

O curtimento é a preparação da pele com o objetivo de eliminar a epiderme e a carne (o colágeno e o tecido adiposo) restando à derme para fabricar o couro. Nesta etapa são utilizadas muitas substâncias, sendo as principais utilizadas: os curtentes vegetais; os sais de metais pesados; azeites de pescado; formaldeído, quinona; ácido silícico e as substâncias sulfatadas (De Barros *et al.*, 1998).

O acabamento é para tornar o couro colorido pela aplicação de corante, obter uma superfície suave pela aplicação de graxas e para torná-lo lustroso e impermeável pela aplicação de caseína ou de goma laca. As peles para a fabricação de couro são: as peles bovinas, ovinas, suínas, eqüinas, e as peles de peixes. As peles de peixes diferem das peles dos mamíferos porque apresentam uma epiderme delgada com escamas ao invés de pelos e com ausência de glândulas sebáceas (De Barros *et al.*, 1998).

1.5 Importância do couro de peixes

Tanto na piscicultura como na indústria dentre os resíduos dos peixes: a cabeça, as nadadeiras, as vísceras, a pele é o principal subproduto e o mais importante. Se a pele for beneficiada resultará em uma matéria-prima de qualidade e de aspecto peculiar e inimitável,

devido à sua resistência e desenho formado na sua superfície. O desenho exótico apresentado nas peles após curtimento compensa o seu reduzido tamanho. O desenho original dessas peles dificilmente pode ser imitado por chapas de impressão sobre outros couros impedindo a falsificação desse tipo de produto. As peles de peixes são consideradas um couro exótico e inovador, com aceitação geral em vários segmentos da confecção (De Barros *et al.*, 1998).

1.6 Potencial do couro de peixe para utilização na indústria calçadista e vestuário.

A resistência do couro dos peixes varia em função de vários fatores, como: a espécie de peixe; composição das fibras colágenas; tamanho do peixe; técnica de curtimento empregada; região da pele e sentido ou direção do couro (longitudinal e transversal ao comprimento do peixe). Assim, o potencial do couro de peixe para a utilização na indústria de calçados e de vestuário, pode ser obtido através dos testes físico-mecânicos, realizados para artefatos produzidos com couro bovino, podendo ser utilizados os mesmos padrões, segundo os padrões da Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT).

No uso do couro de peixe na indústria de calçados e de vestimenta, verificou-se a resistência do couro fabricado com pele de três espécies de peixes: piavuçu *Leporinus macrocephalus* Garavelo & Britski, 1988, pacu prata *Mylossoma* sp. e piraputanga *Brycon hilarii* (Valenciennes, 1850). Constatou-se que, apesar de não existirem parâmetros específicos para os couros provenientes de peixe, as peles das três espécies analisadas têm potencial para serem transformadas em couro, podendo ser aplicadas em diversos artefatos, inclusive para a utilização na confecção de vestuários (Souza *et al.*, 2003).

Na região Amazônica, as peles de várias espécies de peixes podem ser utilizadas na confecção de bolsas, calçados e cintos, aumentando o valor agregado deste subproduto. Os peixes já utilizados são: tucunaré (*Cichla* sp.); tambaqui (*C. macropomum*); pescada (*Plagioscion* sp.); surubim (*Pseudoplatystoma fasciatum* (Linnaeus, 1766), pirarara

Phractocephalus hemiliopterus (Bloch & Schneider, 1801), mapará (*Hypophthalmus* spp.) e pirapitinga (*Piaractus brachypomus* (Cuvier, 1818)) (Rebello, 1998).

1.7 Proteases microbianas na indústria do couro

Nas primeiras décadas do século XX o couro era amaciado com fezes de pássaros e de cachorro. No século XXI descobriu-se que estes excrementos continham proteases de microrganismos, as quais contribuía para a decomposição do couro. Em 1908 foi descoberto o extrato pancreático bovino que continha a enzima tripsina substituindo tais excrementos (De Barros *et al.*, 1998).

Entretanto, mais recentemente, Rao *et al.* (1998) indicaram pontos favoráveis para serem utilizadas proteases microbianas. Elas contribuem com aproximadamente 40% das enzimas existentes no mundo e as enzimas de plantas e de animais não suprem a demanda mundial.

As características dos microrganismos, como a ampla diversidade bioquímica, crescimento rápido e eficaz em espaço limitado e a facilidade de manipulação genética conferem aos microrganismos uma ampla aplicabilidade biotecnológica, tendo uso na indústria de detergentes, de alimentos, do couro e nos diversos processos que envolvem a biorremediação. Na indústria do couro, as proteases microbianas, servem como uma alternativa substituindo os produtos químicos empregados no processo do curtimento contribuindo para reduzir a poluição ambiental (Rao *et al.*, 1998).

1.8 Atividades proteolíticas bacterianas

Desde a década de 1950 já eram conhecidos microrganismos com potenciais proteolíticos, principalmente bactérias para aplicação na área médica. MacLennan *et al.* (1953) estudaram a atividade colagenolítica de 162 cepas de bactérias, entre elas: *Clostridium perfringens*; *C. histolyticum*; *Staphylococcus aureus*; *Streptococcus pyogenes*; *Bacillus* spp.; bactérias da subfamília Enterobacteriaceae (*Proteus vulgaris*; *E.*

coli; a *Myxobacteria* spp.). A espécie que tinha o maior potencial colagenolítico foi *Clostridium histolyticum*, das 82 cepas testadas com atividade colagenolítica.

Também Waldvogel & Swartz (1969) verificaram a atividade colagenolítica de bactérias com crescimento aeróbio e anaeróbio. Elaboraram um gel para ser colocado em placas de Petri. Das 97 bactérias aeróbias selecionadas, apenas uma cepa de *Staphylococcus aureus* produziu atividade colagenolítica, e das 34 bactérias anaeróbias selecionadas apenas em *Clostridium tetani*, *Bacterioides* e *Bacillus melaninogenicus* foram detectadas atividades colagenolíticas, a qual foi confirmada pela liberação do aminoácido hidroxiprolina durante a fase de crescimento.

Merkel *et al.* (1975) estudaram a habilidade de bactérias marinhas em hidrolisar o colágeno através da atividade enzimática. Elaboraram um meio à base de colágeno e isolaram 87 espécies de bactérias verificando que 44% das isoladas foram capazes de elaborar enzimas para hidrolisar o colágeno.

Estudos de Teixeira *et al.* (1996), na Amazônia, detectaram atividade proteolítica por 197 espécies de fungos dos gêneros *Aspergillus* e *Penicillium*. Foram inoculados extratos brutos enzimáticos em “cup-plate” de 8mm de diâmetro, na superfície do ágar gelatina-leite, modificado. Nos “cup-plates” adicionaram 100µl do filtrado da cultura e incubaram a 37°C. Após 18h verificaram a reação enzimática positiva pelo aparecimento de um halo translúcido, sem a adição de reveladores, apenas verificando pelo diâmetro do halo em centímetros medido pelo reverso da placa de Petri. Constataram que apenas 142 espécies tiveram reação proteolítica positiva.

Atualmente, no processamento de couro, estão sendo utilizadas proteases de microrganismos e de bovinos. Elas estão sendo aplicadas em consórcio, sendo a enzima tripsina pancreática bovina com proteases da bactéria *Bacillus* e do fungo *Aspergillus*. Esta

seleção depende do tipo de proteína e da quantidade produzida conforme o tipo de couro que se deseja obter (Rao *et al.*, 1998).

2 JUSTIFICATIVA

Quando os peixes são comercializados, a pele, o principal subproduto é na maioria das vezes desperdiçada, porém quando é transformada em couro agrega valor tornando-se um produto, sendo uma fonte de renda alternativa para o pescador e ou produtor de peixes. Também propicia a geração de empregos porque o processamento do couro, apesar de ser artesanal, é passível de industrialização necessitando assim de força de trabalho. O couro do peixe, no Brasil, ainda é um produto conhecido apenas pelas classes mais favorecidas, sendo na sua maior parte exportada para o Japão, comunidade européia e Estados Unidos. Este produto, comparado com os couros de bovinos e de suínos, amplamente difundidos em todas as classes sociais, reúne em todas as etapas de sua fabricação produtos químicos que poluem o meio ambiente sendo nocivo aos seres vivos. Este trabalho propõe o uso alternativo de substâncias biodegradáveis produzidas por microrganismos como as enzimas visando acelerar o processamento do couro de peixe. Do ponto de vista técnico estaria sendo utilizado um produto natural e biodegradável que poderia ser tão eficiente quanto o mesmo processamento utilizando-se os compostos químicos tradicionais; do ponto de vista puramente científico estaria sendo testada uma nova tecnologia proveniente de microrganismos para o processamento do couro de peixe no Estado do Amazonas; do ponto de vista sócio-econômico ter-se-ia um produto mais barato tornando os artigos de couro de peixe mais acessíveis para a maioria das classes sociais, bem como, estimularia consumo de peixes tanto pela pesca quanto pela piscicultura promovendo assim a geração de novos empregos contribuindo com a melhoria da qualidade de vida da população local; do ponto de vista ambiental estaria sendo realizada uma redução da poluição durante as etapas do processamento de couro.

3 OBJETIVOS

3.1. Objetivo geral

Testar o uso de extrato enzimático bacteriano na degradação do colágeno obtido da pele do tambaqui verificando sua eficiência durante o curtimento da pele.

3.1.1 Objetivos específicos

1. Extrair a gelatina da pele do tambaqui e realizar a caracterização físico-química;
2. Caracterizar a microbiota bacteriana proteolítica do trato gastrointestinal do tambaqui;
3. Detectar a atividade colagenolítica das bactérias obtidas do trato gastrointestinal do tambaqui, a partir do extrato bruto enzimático bacteriano.
4. Verificar a ação do extrato bruto enzimático bacteriano na etapa de remoção de escamas durante a fase de processamento de peles do tambaqui para fabricação de couro.

3.2 Pergunta

O extrato enzimático bacteriano degrada o colágeno da pele do tambaqui reduzindo o tempo de remoção das escamas durante a fabricação de couro de pele de tambaqui?

3.2.1 Hipóteses

Ho: o extrato bruto enzimático das bactérias do trato gastrointestinal do tambaqui não apresenta atividade colagenolítica;

Ho: o extrato bruto enzimático das bactérias do trato gastrointestinal do tambaqui não reduz o tempo de remoção das escamas durante o processamento das peles para a fabricação de couro.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Material

Para a extração da gelatina foram obtidos 10kg de pele de tambaqui do frigorífico Peixam, em Manaus. As peles foram armazenadas em caixas de isopor, entre camadas de gelo, e transportadas para o laboratório de físico-química da Coordenação de Pesquisas em Tecnologia de Alimentos – CPTA/INPA. No laboratório enquanto aguardavam as análises, as peles foram congeladas em congelador a -18°C. Para o isolamento e identificação das bactérias proteolíticas foram obtidos tambaquis inteiros de 15 piscicultores das proximidades de Manaus. Cada tambaqui coletado foi armazenado em caixa de isopor, entre camadas de gelo, e transportado para o laboratório de Microbiologia da Universidade Federal do Amazonas – UFAM para ser imediatamente analisado.

4.2 Metodologia

4.2.1 Isolamento das bactérias proteolíticas

De cada peixe coletado foi obtido o trato digestivo, sendo depois triturado em liquidificador de alumínio esterilizado em autoclave a 121°C por 15 minutos. Do homogeneizado foi retirado 10g sendo transferido para um Erlenmeyer contendo 90mL de solução salina peptonada a 0,1% (p/v) esterilizada, representando a primeira diluição 10^1 . A partir desta foram realizadas diluições seriadas decimais até 10^{10} .

Foi realizado o plaqueamento do inóculo contendo o material do trato gastrointestinal do tambaqui, em superfície, em placas utilizando o agar gelatina segundo Hankin & Anagnostakis (1975), em triplicata. As placas foram incubadas invertidas em estufa microbiológica a 37°C por 24h. As contagens das colônias foram realizadas e imediatamente depois foram selecionadas colônias com atividade proteolítica. As bactérias foram preservadas em solução de 20% (v/v) de glicerol a - 18°C, em triplicata. Posteriormente foram retiradas as peles dos tambaquis para a determinação da composição química centesimal, extração e caracterização física da gelatina para obtenção do agar para a seleção das bactérias proteolíticas e extrato bruto enzimático.

4.2.2 Determinação da composição química centesimal das peles

Umidade

A umidade foi determinada por dessecação de cerca de 10g de amostra, em estufa a 105°C durante 4h (Adolfo Lutz, 1985).

Lipídeos

Os lipídeos foram extraídos com hexano em aparelho de Soxhlet, a partir de 4g de amostra seca (Adolfo Lutz, 1985).

Proteínas

As proteínas foram determinadas pelo método de Micro-Kjeldahl utilizando-se um bloco digestor modelo TE 040-G/45 e um destilador de nitrogênio modelo NT 415 e fator 6,45 (A.O.A.C., 1990).

Resíduo mineral fixo (cinzas)

A cinza foi determinada a partir de 1g de amostra seca. Estas foram carbonizadas em bico de Bunsen e incineradas em mufla a 550°C (Adolfo Lutz, 1985).

Fração Nifext (carboidratos)

Os carboidratos presentes na amostra foram calculados por diferença percentual dos componentes centesimais.

4.2.3 Extração da gelatina da pele do tambaqui

A extração da gelatina da pele do tambaqui foi realizada conforme Da Silva (2004). As peles selecionadas foram submetidas à lavagem, tratamento alcalino, tratamento ácido, limpeza das sujidades, eliminação de impurezas, extração, filtração, congelamento e liofilização.

Determinação do pH

Foi realizado segundo as normas analíticas do Instituto Adolfo Lutz (São Paulo, 1985). Foi coletado 1g de gelatina de tabaqui e transferido para um becker de 10ml e homogeneizado posteriormente com água destilada e fervida. O pH foi medido em potenciômetro digital da marca Micronal, modelo B441 (British Standard, 1975).

4.2.4 Obtenção do extrato bruto enzimático

A partir dos isolados preservadas em solução de glicerol 20% (v/v) foi realizada a reativação transferindo-se três alçadas para um Erlenmayer de 50 mL contendo 5mL de caldo nutriente e incubando-se posteriormente em shaker orbital (150 rpm, 37°C por 12h). Depois de 12h de incubação de cada Erlenmayer retirou-se um inóculo de 500µL transferido-se para um Erlenmayer de 50 mL contendo 5mL de solução de Manachini [(K₂H₄PO₄ 40% (p/v), (NH₄)₂SO₄ 20% (p/v), MgSO₄.7H₂O 2% (p/v), Na₂HPO₄.2H₂O 18% (p/v), extrato de levedura 20% (p/v) e água destilada (1000 mL)] suplementada com 0,5% (p/v) de gelatina comercial (DIFCO) onde o pH final foi ajustado para 6,9. Os ensaios foram realizados, em triplicata. Os Erlenmayers foram incubados por mais 12h nas mesmas condições descritas acima. Após o período de 24h o sobrenadante foi obtido por filtração (EQUIPAR 0,22 µm) denominado de extrato bruto enzimático.

4.2.4.1 Detecção da atividade enzimática do extrato bruto

Na determinação da atividade enzimática qualitativa foi utilizado o meio de cultura agar gelatina leite-modificado (agar 80% (p/v), tampão citrato-fosfato 0,1M (pH 5,0 para 400 mL); solução de leite 10% (p/v) (50 mL); solução de gelatina comercial 10% (p/v) DIFCO (50mL) segundo Teixeira *et al.* (1996) e o meio de cultura agar gelatina de peixe-leite modificado com a mesma composição do agar descrito segundo Teixeira *et al.* (1996), exceto com a modificação substituindo-se a gelatina comercial pela gelatina de tabaqui liofilizada e preparada na mesma proporção daquele agar.

Os meios de cultura foram distribuídos em placas de Petri descartáveis de 15mm x 100 mm formando uma camada de aproximadamente 4mm . Após a solidificação a temperatura ambiente, as placas foram armazenadas sob refrigeração a (4°C) por uma hora. Após este período foram feitos os furos “cup-plate” na superfície de cada agar com um tubo de vidro oco de 10mm de diâmetro. Cada placa continha três furos mais um controle negativo.

Depois foi caracterizada a atividade proteolítica pela presença de um halo transparente observado no reverso da placa medindo-se cada halo da triplicata. Nos “cup-plates” foram adicionados 100µL de extrato enzimático bruto sendo incubados em estufa microbiológica a 37°C por 18h. A observação da reação enzimática positiva foi visualizada pela formação de halos translúcidos em torno dos “cup-plates”. Para evitar a evaporação do filtrado, as placas foram protegidas com papel alumínio durante a permanência na estufa microbiológica. A atividade enzimática foi determinada pelo tamanho dos halos em milímetros, medindo-se o diâmetro do halo pelo reverso da placa de Petri (Teixeira *et al.*, 1996).

4.2.4.2 Determinação da atividade proteolítica

Na determinação da atividade enzimática quantitativa foi utilizado como substrato a azocaseína 1% (p/v), (SIGMA, St. Louis, MOUSA) preparada em tampão acetato-fosfato pH 7,2. A mistura-reação foi realizada em tubos de ensaio esterilizados colocados no banho-maria. Adicionou-se 250µL azocaseína 1% (p/v) em tubos, em triplicata. Depois foi adicionado 150µL do extrato bruto incubando-se esta mistura por 1 hora a 37°C. A reação foi interrompida pela adição de 1200µL de ácido tricloroacético 10% (p/v), deixando-se esta reação incubada por 15 minutos a 4°C para a total precipitação. Depois foi centrifugada em centrífuga refrigerada a 8000rpm por 10 minutos a 4°C. Foi coletado 1200µL do sobrenadante e neutralizado com 1400µL de solução de NaOH 1M. Todas as análises foram realizadas em triplicata e o branco foi preparado mantendo-se nas mesmas condições da amostra. Uma unidade de atividade proteásica foi definida como a quantidade de enzima capaz de produzir um aumento na absorbância de 0,001 em uma hora (Leighton *et al.*, 1973).

4.3 Teste da degradação do colágeno

Na determinação da atividade colagenolítica utilizou-se o agar gelatina-leite modificado descrito por Teixeira *et al.* (1996) com a substituição da gelatina comercial pelo colágeno em pó, nas mesmas proporções daquele agar. A atividade colagenolítica positiva foi identificada pela formação de um halo ao redor do “cup-plate”. A atividade enzimática foi relacionada com o tamanho do halo em milímetros, medindo-se no reverso da placa de Petri.

4.4 Identificação das bactérias proteolíticas

Os isolados selecionados pelo teste da atividade colagenolítica foram identificados com base nas características morfológicas e de acordo com os testes realizados pelo kit API

20 NE fabricado pela Biomériux baseado em 20 testes bioquímicos. Para a identificação através do kit API 20 NE este foi incubado a 37°C por 24h e novamente incubado por 24h para a confirmação definitiva das espécies.

4.5 Obtenção do inóculo para a construção da curva de crescimento

O inóculo para a construção da curva de crescimento foi preparado com os isolados selecionados através da determinação da atividade enzimática quantitativa. Primeiramente os isolados foram reativados a partir de tubos com agar nutriente contendo as colônias puras. Foram repicados, com auxílio da alça de platina, para erlenmeyers contendo 5mL de caldo nutriente e incubadas em shaker orbital (150rpm, 37°C por 12h).

Após foi realizada a semeadura em placas com agar nutriente, por esgotamento, com auxílio de alça de Drigalski utilizando-se 100µL de inóculo. As placas foram incubadas invertidas em estufa microbiológica a 37°C por 12h. Depois deste período foram retiradas alçadas e transferidas para tubos, em duplicata, contendo água destilada esterilizada e foi preparado o inóculo de concentração número 1(um) da escala de Macfarland (Silva *et al.*, 1997).

Para a construção da curva de crescimento foi utilizado 25mL de inóculo preparando-se na concentração do número um na escala de Macfarland. Este volume foi adicionado a um Erlenmayer contendo 250mL de solução de Manachini com pH final ajustado para 6,9. Posteriormente foi incubado em shaker orbital (150rpm, 37°C por 24h). No tempo zero e a cada três horas até 24h foram retiradas alíquotas de 2mL para serem lidas em espectrofotômetro a 660nm, em duplicata, e alíquotas de 2mL para obtenção do extrato bruto, em duplicata conforme citado acima para a leitura do pH em potenciômetro digital.

4.6 Caracterização das proteases

Efeito da temperatura e pH na atividade proteolítica

A atividade proteolítica do extrato bruto foi medida em diferentes valores de pH em condições padrões usando como substrato a azocazeína 1% (p/v) no tempo de 1 hora. O efeito do pH com a atividade proteolítica foi medido utilizando-se diferentes tampões: pH 6,0-8,0 tampão; Fosfato 0,1M e pH 9,0-10,0 tampão carbonato-bicarbonato de sódio 0,1M em diferentes valores de temperatura na faixa de 25°C-80 °C nas mesmas condições acima (Leighton *et al.*, 1973).

O efeito da temperatura e pH na estabilidade da atividade proteolítica foi medido incubando-se o extrato bruto a 37°C em diferentes tampões pH 6,0-8,0, Fosfato 0,1M e pH 9,0-10,0, carbonato-bicarbonato de sódio 0,1M no tempo zero e a cada 15 minutos até 90 minutos, em duplicata (Leighton *et al.*, 1973). Depois da incubação a atividade proteolítica foi medida a 37°C usando-se o tampão Fosfato 0,1M, pH 8.0 para a determinação da estabilidade térmica, o extrato bruto foi incubado nas temperaturas de 25°-80°C no tempo zero e a cada 15 minutos até 90 minutos, em duplicata, determinando-se a atividade proteolítica usando como substrato a azocazeína 1% (p/v) no tempo de 1h (Moreira *et al.*, 2002).

4.7 Efeito do tempo e agitação no tratamento dos fragmentos de pele de tambaqui pelo extrato bruto testado a 25°C.

A partir da verificação da temperatura e atividade ótimas de crescimento de acordo com o sub-item 4.6 respectivamente testou-se o efeito do extrato bruto produzido nas condições (150 rpm, 25°C, 24h) sobre os fragmentos de pele de tamanho de aproximadamente 6cm² (3cm de largura x 2cm de comprimento), previamente pesados em balança semi-analítica, obtidos da região da primeira nadadeira dorsal do lado esquerdo do tambaqui.

Foi realizado um teste a 25°C nas condições sem agitação e com agitação em shaker orbital (150rpm; 1h, 2h e 3h). Foram preparados cinco Erlenmeyers com volumes de 10mL cada, preparando-se três repetições para cada tratamento: tratamento 1 = controle negativo com água destilada; 2 = controle positivo com solução de papaína 0,02% (p/v); 3, 4 e 5 com extrato bruto para 1h, 2h e 3h respectivamente. Foi realizada análise sensorial com cinco julgadores treinados em curtimento de couro para a verificação da remoção das escamas utilizando a pontuação: A = ao raspar com a colher apresenta resistência; B = ao raspar com a colher esta mais flexível.

Determinação das proteínas totais

As proteínas totais foram determinadas pelo método de Lowry *et al.* (1951) para avaliar o efeito dos tratamentos em que foi utilizado o extrato bruto utilizando-se a proporção de 1mg/mL de proteínas totais.

4.8 Efeito da concentração da enzima do extrato bruto

A partir da escolha do melhor tempo conforme o sub-ítem 4.7 foi verificado o efeito do extrato bruto sobre os fragmentos de pele de tamanho de aproximadamente 6cm^2 (3cm de altura x 2cm de largura), previamente pesados em balança semi-analítica, obtidos da região da primeira nadadeira dorsal do lado esquerdo do tambaqui. Foram testados os tratamentos contendo três repetições cada: controle negativo com água destilada; controle positivo com solução de papaína 0,02% preparada em tampão Tris-HCl pH 7,6; tratamento 1 (1 extrato bruto : 1 água destilada); tratamento 2 (1 extrato bruto : 10 água destilada); e tratamento 3 (1 extrato bruto : 100 água destilada).

Foi realizada análise sensorial com três julgadores treinados em curtimento de couro para a verificação da remoção das escamas utilizando a pontuação: A = ao raspar com a colher a escama sai com dificuldade; B = ao raspar com a colher a escama sai com pouca dificuldade; C = ao raspar com a colher a escama sai com uma certa facilidade; e D = ao raspar com a colher a escama sai com facilidade.

4.8.1 Análise histológica dos fragmentos de pele que sofreram a ação do extrato bruto para a remoção das escamas

Foram realizados estudos histológicos para verificar a estrutura do tecido colagenoso verificando a ação de enzimas proteolíticas do extrato bruto. Esta análise foi realizada, a partir de fragmentos de pele de 6cm^2 no decorrer do experimento realizado de acordo com o sub-ítem 4.8.

De cada fragmento de pele foi retirado um novo fragmento de 2cm^2 (2 cm de altura x 1 cm de largura) com auxílio de um bisturi e colocado em formol 10% para análise histológica em microscópio óptico. Depois esses fragmentos foram transferidos para concentrações crescentes de álcoois e inclusas em parafina. Após, foram cortados em micrótomo com aproximadamente 5mm de espessura, e coradas pela técnica de hematoxilina-eosina (HE) segundo Luna (1968).

4.9 Efeito do extrato bruto para verificar a remoção das escamas das peles inteiras de tambaqui e avaliação sensorial

A partir da escolha do melhor tempo e condição de agitação conforme o sub-ítem 5.7 foi verificado o efeito do extrato bruto sobre as peles inteiras de tambaqui. Foram testadas 9 peles do lado direito do corpo do tambaqui, sendo 2 peles, uma mergulhada no controle

negativo com água destilada e outra no controle positivo contendo solução de papaína 0,02% (p/v) preparada em tampão Tris-HCl pH 7,6 e 7 peles no tratamento 2 (1 extrato bruto : 10 água destilada).

Para a determinação do tratamento em que foi utilizado o extrato bruto foi determinada a concentração das proteínas totais por Lowry *et al.* (1951), sendo a proporção das proteínas totais calculada para 1mg/mL.

Avaliação sensorial do efeito do extrato bruto sobre as peles inteiras

A avaliação sensorial foi realizada com dois julgadores treinados em curtimento de couro para a verificação da remoção das escamas utilizando a pontuação: A = ao raspar com a colher a escama sai com dificuldade; B = ao raspar com a colher a escama sai com pouca dificuldade; C = ao raspar com a colher a escama sai com uma certa facilidade; e D = ao raspar com a colher a escama sai com facilidade.

5 RESULTADOS

5.1 Seleção dos isolados produtores de proteases do trato gastrointestinal do tambaqui

Após o isolamento de 172 produtores de protease do trato gastrointestinal do tambaqui com agar gelatina usando gelatina comercial segundo Hankin & Anagnostakis (1975) foi feita à preservação em glicerol a 20% em freezer a -18°C. Após foi realizada a extração da gelatina da pele do tambaqui segundo Da Silva (2004) e a caracterização físico-química da gelatina para ser testado potencial dos isolados quanto à degradação da gelatina obtida do tambaqui.

5.1.1 Extração e caracterização físico-química da gelatina

A partir da extração da gelatina utilizando pele de tambaqui, segundo Da Silva (2004), foram utilizados os procedimentos de: lavagem inicial das peles; banhos alcalinos e ácidos; extração propriamente dita a 60°C por 18h até a liofilização. Foram obtidas as relações de peso (kg) de pele sem escamas/peso da gelatina líquida filtrada, e peso da gelatina líquida filtrada/peso da gelatina liofilizada de 1:1,7 e 1:0,14 respectivamente. O rendimento de gelatina liofilizada foi de 14% sobre 1kg de gelatina líquida filtrada. Esta gelatina apresentou o pH 4,0 medido a partir de 10 g de gelatina em 100 mL de água destilada fervida.

Composição química centesimal da gelatina

Da composição química centesimal da gelatina obtida foram verificadas as percentagens de umidade, lipídeos, proteínas, cinzas e carboidratos (Nifext) está apresentada na tabela 1 e nesta pode-se verificar que a porcentagem de proteínas teve em média 68,20% (tabela 1).

Tabela 1. Composição química centesimal da gelatina obtida a partir da pele do tambaqui proveniente de cultivo em Manaus – AM.

Medidas	Umidade (%)	Lipídeos (%)	Proteínas (%)	Cinzas (%)	Nifex (%)
Média ± Desvio padrão	29,22 ± 0,94	0,64 ± 0,63	68,20 ± 0,62	0,52 ± 0,02	1,45 ± 1,46

Após a extração e caracterização físico-química da gelatina obtida a partir da pele do tambaqui foi realizada uma nova seleção dos 172 isolados preservados em glicerol a 20%.

Esses isolados foram reativados em agar nutriente e semeados paralelamente com agar gelatina leite usando gelatina comercial (agar gelatina leite segundo Teixeira *et al* (1996)) e com agar gelatina leite usando gelatina de peixe (gelatina extraída da pele do tambaqui

apresentado na figura 3 e foram selecionados para os estudos de caracterização da enzima do extrato bruto.

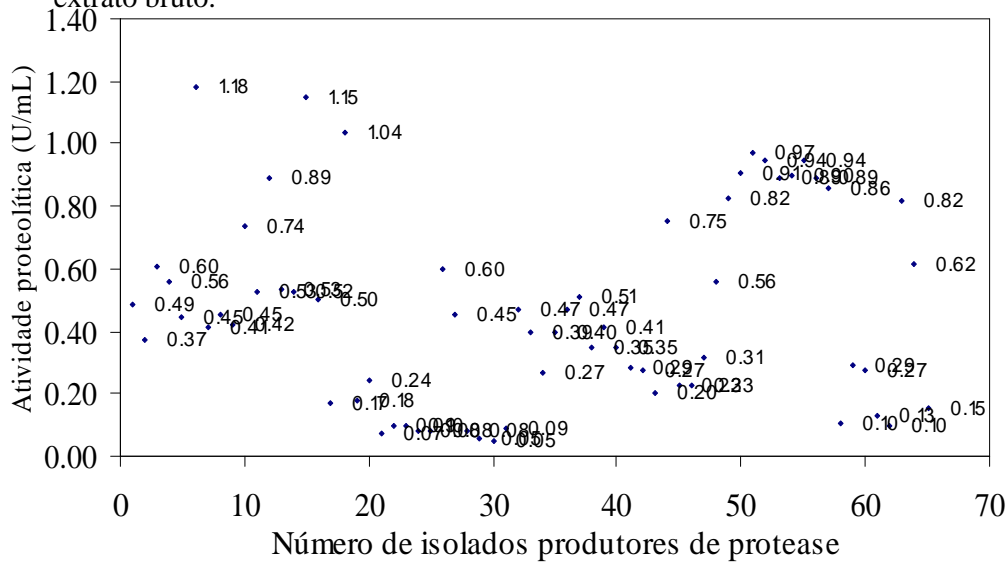


Figura 3. Seleção dos 65 isolados pela atividade proteolítica em azocazeína 1% preparada em tampão Tris-HCl pH 7,2 em 1h a 37°C e medida a 440nm.

Teste de degradação de colágeno

Os isolados selecionados para o teste da degradação do colágeno foram aqueles que apresentaram valores de atividade proteolítica quantitativa maiores que 1 U/mL em agar gelatina colágeno denominado de agar colágeno leite - ACL obtido pela substituição da gelatina comercial pelo colágeno. Estes resultados estão apresentados na figura 3 onde o isolado no. 1 tem a atividade proteolítica de 1,18 U/mL, isolado 2 de 1,04 U/mL e o isolado 3 de 1,14 U/mL. Os valores de diâmetro de halo do teste da degradação do colágeno para os isolados 1, 2 e 3 foram: 21 mm, 19,7 mm e 18,7 mm respectivamente, e o isolado número 1 apresentado na figura 4 representa o teste da degradação do colágeno. Este isolado foi selecionado para os estudos da caracterização da enzima do extrato bruto e os três isolados foram identificados no nível de espécie.

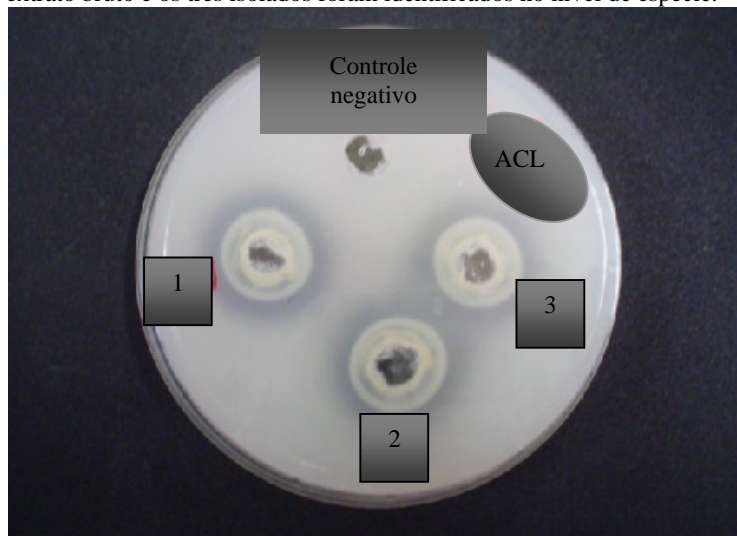


Figura 4: halos de atividade colagenolítica positiva do extrato bruto do isolado numero 1 em agar colágeno leite (ACL) incubado a 37°C por 24h.

5.2 Identificação dos isolados

Os três isolados que apresentaram os maiores valores de atividade proteolítica foram identificados com base nas características morfotintoriais e pelas características bioquímicas dos testes do Kit API 20 NE (Biomériux). Este kit é baseado em 20 testes bioquímicos, são eles: 1)NO₃ = nitrato de potássio; 2)TRP = L-triptofano; 3)Glu = D-glucose; 4)ADH = L-arginina; 5)URE = uréia; 6)ESC = esculina citrato de ferro; 7)GEL = gelatina (origem bovina); 8)PNPG = 4-nitrofenil- βd-galactopiranosídeo; 9) GLU = D-glucose; 10)ARA = L-arabinose; 11) MNE = D-manose; 12) MAN = D-manitol; 13) NAG = N-acetil-glucosamina; 14) MAL = D-maltose; 15)GNT = potássio gluconato ; 16) CAP = ácido caprato; 17) ADI = ácido adipato;18)MLT = ácido malato; 19) CIT = citrato de trisódio; 20)PAC = ácido fenil-acetato. Para a identificação o Kit API 20 NE foi incubado a 37°C por 24h e novamente incubado por 24h para a confirmação definitiva das espécies.

De acordo com os resultados o isolado no.1 foi identificado como a bactéria *Chryseomonas luteola*, possuindo as características bioquímicas apresentadas na tabela 2.

Tabela 2: Características bioquímicas da bactéria *Chryseomonas luteola* conforme o Kit API 20 NE

Número de teste	TESTES	RESULTADO
1	NO ₃	+
2	TRP	-
3	GLU	-
4	ADH	-
5	URE	-
6	ESC	+
7	GEL	+
8	PNG	+
9	GLU	+
10	ARA	+
11	MNE	+
12	MAN	+
13	NAG	+
14	MAL	+
15	GNT	+
16	CAP	-
17	ADI	-
18	MLT	+
19	CIT	+
20	PAC	-

NO₃ = nitrato de potássio; TRP = L-triptofano; Glu = D-glucose; ADH = L-arginina; URE = uréia; ESC = esculina citrato de ferro; GEL = gelatina (origem bovina); PNG = 4-nitrofenil-β-D-galactopiranosídeo; GLU = D-glucose; ARA = arabinose; MNE = D-manose; MAN = D-manitol; NAG = N-acetil-glucosamina; MAL = D-maltose; GNT = potássio gluconato; CAP = ácido caprato; ADI = ácido adipato; MLT = ácido malato; CIT = citrato de trisódio; PAC = ácido fenil-acetato.

O resultado dos isolados 2 e 3 que foram identificados como a bactéria *Brevundimonas vesiculares* com uso do Kit API 20 NE está apresentado na tabela 3.

Tabela 3: Características bioquímicas da bactéria *Brevundimonas vesiculares* conforme os resultados do Kit API 20 NE

Número do teste	TESTES	RESULTADO
1	NO ₃	-
2	TRP	-
3	GLU	-
4	ADH	-
5	URE	-
6	ESC	+
7	GEL	+
8	PNG	+
9	GLU	-
10	ARA	-
11	MNE	-
12	MAN	-
13	NAG	-
14	MAL	-
15	GNT	-
16	CAP	-
17	ADI	-
18	MLT	-
19	CIT	-
20	PAC	-

NO₃=nitrato de potássio;TRP= L-triptofano; Glu=D-glucose; ADH= L-arginina; URE=uréia; ESC= esculina citrato de ferro; GEL=gelatina (origem bovina);PNPG= 4-nitrofenil-βD-galactopiranosídeo;GLU=D-glucose; ARA=arabinose;MNE= D-manose;MAN= D-manitol;NAG= N-acetil-glucosamina;MAL= D-maltose; GNT= potássio gluconato; CAP=ácido caprato; ADI=ácido adipato; MLT=ácido malato; CIT=citrato de trisódio; PAC= ácido fenil-acetato.

5.3 Características da protease do extrato bruto obtida de *C. luteola*

5.3.1 Efeito da temperatura e pH na atividade proteolítica

O efeito do pH na atividade proteolítica obtido da protease de *C. luteola* determinado com substrato de azocazeína 1% a 37°C em 1h esta apresentado na figura 5 e indicou pH ótimo 7,2 com atividade proteolítica de 4,01 U/mL.

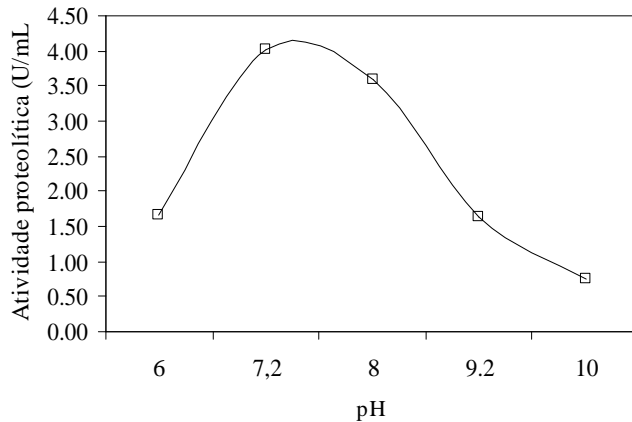


Figura 5. Efeito do pH na atividade proteolítica medido em diferentes tampões: pH 6,0-8,0 tampão Fosfato 0,1M e pH 9,0-10,0 tampão carbonato-bicarbonato de sódio 0,1M com substrato azocazeína 1% incubado a 37°C por 1 hora.

O efeito da temperatura na atividade proteolítica obtido da protease de *C. luteola* apresentado na figura 6 foi medido em diferentes temperaturas de 25°C - 80°C e determinado com o substrato azocazeína 1% em 1h.

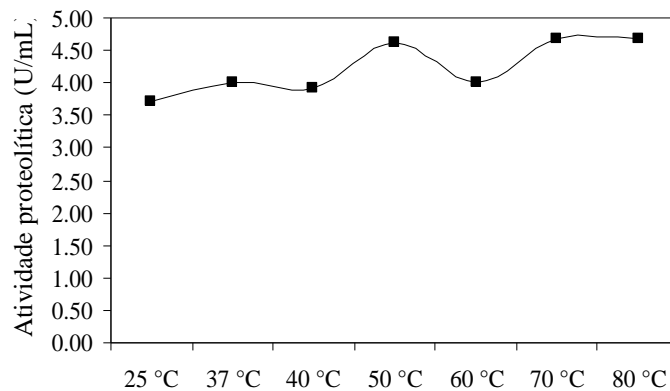


Figura 6. Efeito da temperatura na atividade proteolítica medido em diferentes temperaturas de 25 °C – 80 °C com substrato azocazeína 1% incubado a 37°C por 1 hora.

Os resultados que estão na figura 6 indicam que a temperatura ótima variou na faixa de 70°C a 80°C

5.3.2 O efeito da temperatura e pH na estabilidade da atividade proteolítica

O efeito do pH obtido da protease de *C. luteola* que está apresentado na figura 7 foi medido em diferentes tampões pH 6,0-8,0 tampão Fosfato 0,1M e pH 9,0-10,0 tampão carbonato-bicarbonato de sódio 0,1M e foi determinado com substrato de azocazeína 1% a 37°C em 1h

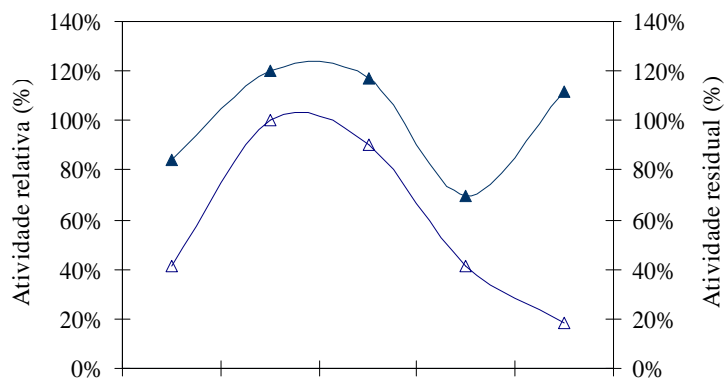


Figura 7. Efeito do pH na atividade (Δ) e estabilidade (▲) da protease medido em diferentes tampões: pH 6,0-8,0 tampão Fosfato 0,1M e pH 9,0-10,0 tampão carbonato-bicarbonato de sódio 0,1M com substrato azocazeína 1% incubado a 37°C por 1 hora em 90 minutos, em duplicata, medido a 440 m.

Os resultados apresentados na figura 7 indicaram que a máxima atividade relativa (100%) ocorreu no pH 7,2 com atividade residual neste ponto de 120%.

O efeito da temperatura na atividade relativa e estabilidade residual conforme se apresenta na figura 8 foi medido em diferentes temperaturas de 25°C a 80°C e determinado com o substrato azocazeína em 1h.

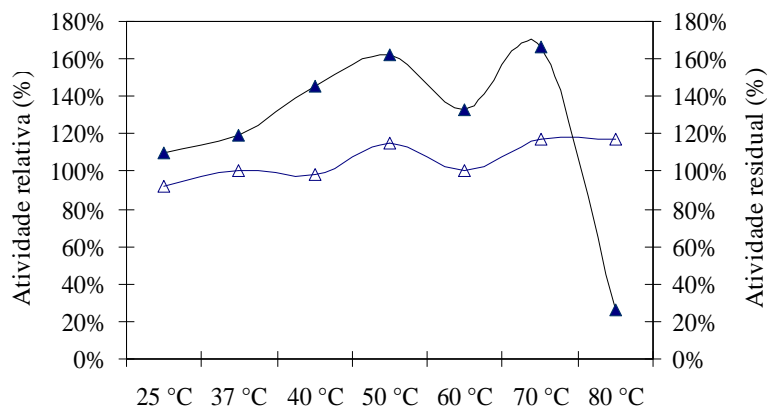


Figura 8. Efeito da temperatura na atividade (Δ) e estabilidade (▲) da protease medido em diferentes temperaturas de 25 °C – 80 °C com substrato azocazeína 1% preparado em pH 8,0 incubado por 1 hora em 90 minutos, em duplicata.

Estes resultados indicaram que na atividade relativa a 37°C de 100% a atividade residual foi de 119%. Na faixa de 70°C a 80°C a atividade relativa foi 117% respectivamente, enquanto que a atividade residual a 70°C foi de 166% sofrendo uma redução em 80°C para 26%.

5.3.3 Curva de crescimento e de produção de atividade proteolítica de *C. luteola*

Na figura 9 são apresentados os resultados do crescimento de *C. luteola* e atividade proteolítica da protease do extrato bruto de *C. luteola*. O crescimento foi realizado com inóculo preparado na escala de Macfarland 1 e determinado nas condições de 37°C, 150rpm por 24h e medido a 660nm. A atividade proteolítica da protease do extrato bruto foi determinada nas mesmas condições acima com o substrato azocazeína 1% a 37°C em 1h e medida a 440nm.

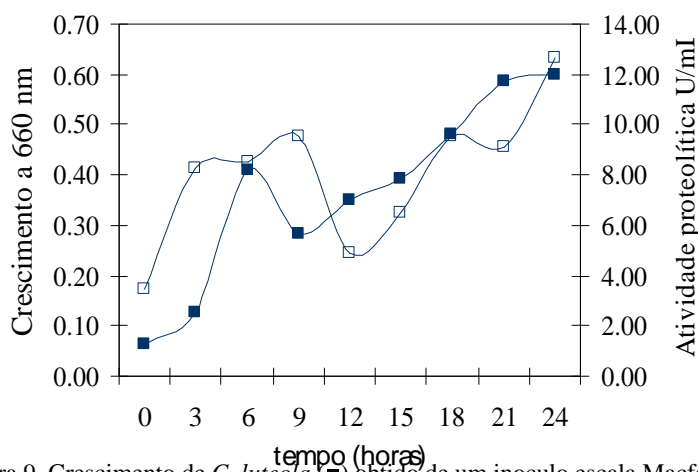


Figura 9. Crescimento de *C. luteola* (■) obtido de um inóculo escala Macfarland 1 em shaker por 24h a 37°C medido a 660nm. Atividade proteolítica da protease do extrato bruto de *C. luteola* (□) produzido em shaker por 24h a 37°C e determinada em substrato azocazeína 1% em 1h.

Os resultados da figura 9 indicam que a atividade proteolítica do extrato bruto foi de 3,50U/mL no tempo zero e em 24h a máxima de 12,67 U/mL. Em 6h de crescimento pode-se observar um pico de atividade proteolítica de 8,50 U/mL, enquanto que com 24h o valor obtido foi 12,67U/mL, portanto 1,5 vezes maior. Sendo a amostra obtida nesta hora selecionada para os testes de caracterização da protease.

5.4 Seleção da temperatura ótima de crescimento da *C. luteola* e atividade proteolítica da protease do extrato bruto

A seleção da temperatura ótima de crescimento de *C. luteola* apresentada na figura 10 foi determinada com o inóculo preparado na escala de Macfarland 1 sendo submetido às

condições de 150rpm por 24h nas temperaturas de 25°C a 50°C e medida a 660nm.

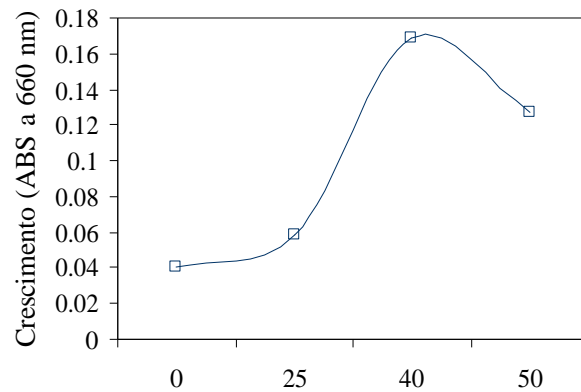


Figura 10. Crescimento de *C. luteola* obtido de um inóculo escala Macfarland 1 nas condições 150 rpm por 24h nas temperaturas de 25°C a 50°C medido a 660nm

O resultado apresentado na figura 10 indica que a temperatura ótima de crescimento da *C. luteola* foi de 40°C.

A atividade proteolítica do extrato bruto de *C. luteola* apresentada na figura 11 foi obtida nas temperaturas de crescimento de 25°C a 50°C e determinada com substrato azocazeína 1% preparado em pH Tris-HCl 7,6 em 1h e medida a 440nm.

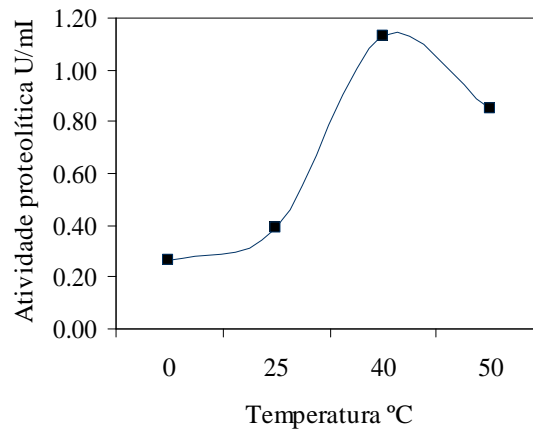


Figura 11. Atividade proteolítica de *C. luteola* obtido do extrato bruto a partir de um inóculo escala Macfarland 1 que cresceu nas condições 150 rpm por 24h nas temperaturas de 25°C a 50°C determinado com o substrato azocazeína 1% preparada em pH 7,6 em 1h e medido a 440 nm

O resultado que consta na figura 11 indica que a maior atividade ocorreu a 40°C com o

valor médio de 1,13 U/mL.

5.4.1 Efeito do tempo e agitação no tratamento dos fragmentos de pele de tambaqui pelo extrato bruto testado a 25°C.

A seleção do tempo e agitação foi testada com o extrato bruto de *C. luteola* produzido nas condições de 150rpm por 24h a 25°C e testado posteriormente nas condições: com agitação (150rpm, 1h, 2h e 3h a 25°C) e sem agitação (1h, 2h e 3h a 25°C). Depois de cada tempo, em cada condição era retirado um fragmento para serem retiradas as escamas com a colher e paralelamente era retirado uma alíquota de 150µL do extrato bruto para a determinação da atividade proteolítica com o substrato azocazeína 1% preparado em tampão Tris-HCl pH 7,6 em 1h a 25°C e medido a 440nm.

Os resultados da retirada das escamas de cada fragmento eram paralelamente comparados com um controle negativo contendo água destilada. Os resultados obtidos a partir da análise de variância – ANOVA para dois fatores indicaram que houve diferença significativa quanto à condição de agitação ($p=0,000$) com $\alpha=5\%$ sendo que houve maior atividade proteolítica na condição com agitação. A atividade na condição com agitação foi 3,84U/mL e na condição sem agitação foi de 3,40U/mL. Houve diferença significativa com $\alpha=5\%$ nos tempos de incubação ($p=0,001$) e as atividades proteolíticas nos tempos de 1h, 2h e 3h foram todas diferentes, sendo 3,71U/mL, 3,58 U/mL e 3,45 U/mL respectivamente.

Neste estudo, embora o valor médio de atividade proteolítica do extrato bruto tenha sido maior do que o valor médio de atividade proteolítica do extrato bruto sem agitação optou-se pelo tratamento sem agitação. Isto devido ao tipo de sistema de curtimento utilizado ser, sem agitação, e no tempo de 1h por ter o maior valor de atividade enzimática do extrato bruto.

5.4.1.1 Avaliação sensorial realizada nos fragmentos de pele de tambaqui nos tempos de 1h, 2h e 3h.

A avaliação sensorial foi realizada nos tempos de 1h, 2h e 3h utilizando-se 5 julgadores treinados em curtimento de pele. Todos os julgadores comparavam a pele submetida à ação do extrato no determinado tempo e condição de agitação com uma pele submetida a um controle negativo com água destilada. Os julgadores atribuíam às notas: A = ao raspar com a colher apresenta resistência; B = ao raspar com a colher apresenta mais resistência; C = ao raspar com a colher apresenta-se flexível. Os resultados para 1h estão apresentados na figura 12.

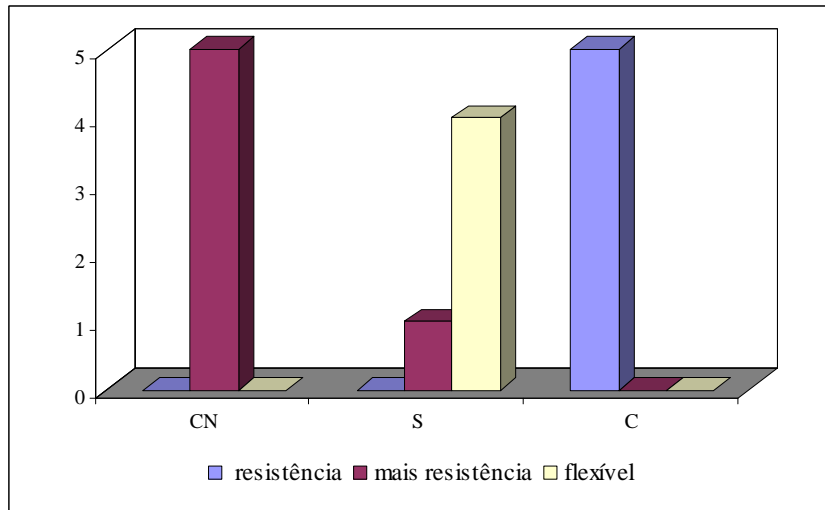


Figura 12. Avaliação da análise sensorial dos fragmentos de pele tabaqui submetidos aos tratamentos: CN= controle negativo; S= sem agitação por 1h; C= com agitação a 150rpm por 1h. A nota atribuída aos fragmentos foi: A = ao raspar com a colher apresenta resistência; B = ao raspar com a colher apresenta mais resistência; C=ao raspar com a colher apresenta-se flexível.

No resultado apresentado na figura 12 para o tempo de 1h todos os julgadores encontraram mais resistência ao retirar a escama com a colher dos fragmentos de pele do controle negativo; 83,33% dos julgadores consideraram os fragmentos de pele flexíveis ao retirar a escama com a colher no tratamento sem agitação, e todos os julgadores encontraram resistência ao retirar a escama com a colher no tratamento com agitação.

No resultado apresentado na figura 13 para o tempo de 2h todos os julgadores encontraram mais resistência ao retirar a escama com a colher dos fragmentos de pele do controle negativo. Todos os julgadores consideraram os fragmentos de pele flexíveis ao retirar a escama com a colher no tratamento sem agitação. No tratamento com agitação 60% dos julgadores acharam os fragmentos de pele flexíveis ao retirarem a escama com a colher e 40% encontraram resistência ao retirar a escama com a colher.

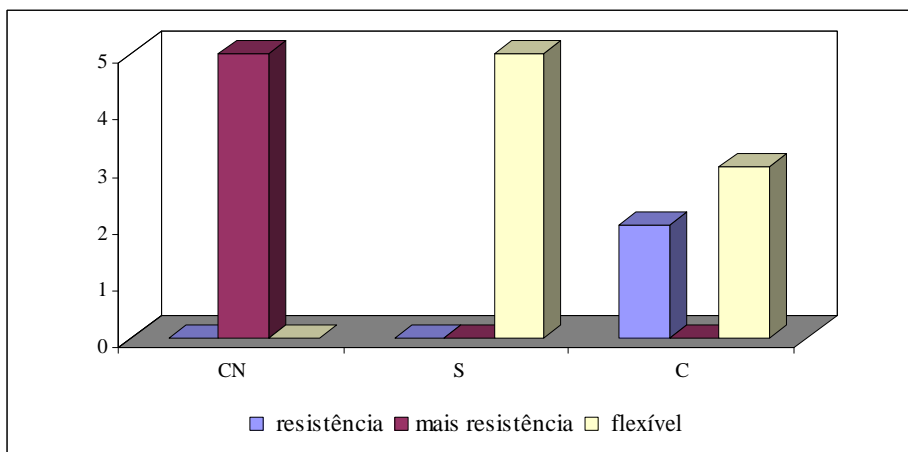


Figura 13. Avaliação da análise sensorial dos fragmentos de pele tampaqui submetidos aos tratamentos: CN = controle negativo; S = sem agitação por 2h; C = com agitação a 150rpm por 2h. A nota atribuída aos fragmentos foi: A = ao raspar com a colher apresenta resistência; B = ao raspar com a colher apresenta mais resistência; C = ao raspar com a colher apresenta-se flexível.

No resultado apresentado na figura 14 para o tempo de 3h todos os julgadores encontraram mais resistência ao retirar a escama com a colher dos pedaços de pele do controle negativo. Todos os julgadores consideraram os pedaços de pele flexíveis ao retirar a escama com a colher no tratamento sem agitação e com agitação.

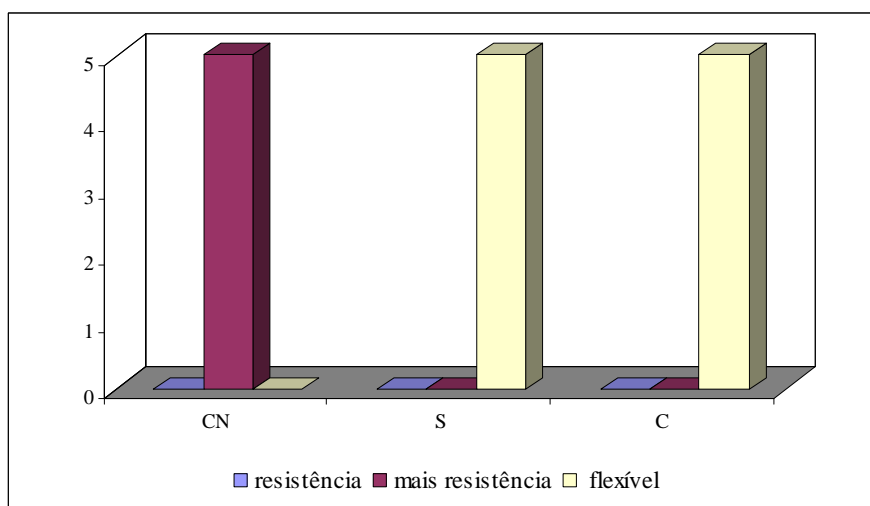


Figura 14. Avaliação da análise sensorial dos fragmentos de pele tampaqui submetidos aos tratamentos: CN = controle negativo; S = sem agitação por 3h; C = com agitação a 150rpm por 3h. A nota atribuída aos fragmentos foi: A = ao raspar com a colher apresenta resistência; B = ao raspar com a colher apresenta mais resistência; C = ao raspar com a colher apresenta-se flexível.

5.4.2 Teste do efeito do extrato bruto enzimático de *C. luteola* produzido a 40°C e testado a 25 °C em fragmentos de pele de tampaqui para verificar a remoção das escamas

Para testar o efeito do extrato bruto enzimático de *C. luteola* foi utilizado o extrato bruto produzido nas condições: a 150 rpm por 24h e 40°C. Foram utilizados 15 fragmentos de pele de 6 cm² conforme estão apresentados na tabela 8 com o peso médio e desvio padrão de 0,67 g ± 0,08 g e coeficiente de variação de 12,55%.

Tabela 4. Peso (g) dos fragmentos de pele de 6cm² (3cm largura x 2 cm comprimento). do tabaqui *C. macropomum*.

Pele (n)	Peso (g)	Pele (n)	Peso (g)	Pele (n)	Peso (g)
1	0,78	6	0,68	11	0,48
2	0,71	7	0,70	12	0,70
3	0,70	8	0,68	13	0,50
4	0,60	9	0,67	14	0,75
5	0,62	10	0,71	15	0,70

5.4.2.1 Dosagem de proteínas totais do extrato bruto de *C. luteola*

Com a determinação de proteínas totais do extrato bruto de *C.luteola* conforme a metodologia de Lowry *et al.* (1951) a quantidade de proteínas totais foi 7,3mg/mL. A quantidade 1mg de proteínas totais correspondeu a 0,14 mL. Neste estudo fizeram-se os tratamentos: CN = água destilada (14mL); CP = papaína em tampão Tris-HCl pH 7,6; 1 = (1:1) de extrato bruto: água destilada, sendo (14mL: 14mL); 2 = (1:10) e 3 = (1:100).

5.4.2.2 Determinação da atividade enzimática quantitativa do extrato bruto de *C. luteola* em 1h

Os valores de atividade proteolítica que estão apresentados na figura 15 foram determinados testando-se os fragmentos de pele de tabaqui com os tratamentos citados no subitem 5.4.2.1 durante 1h na condição sem agitação

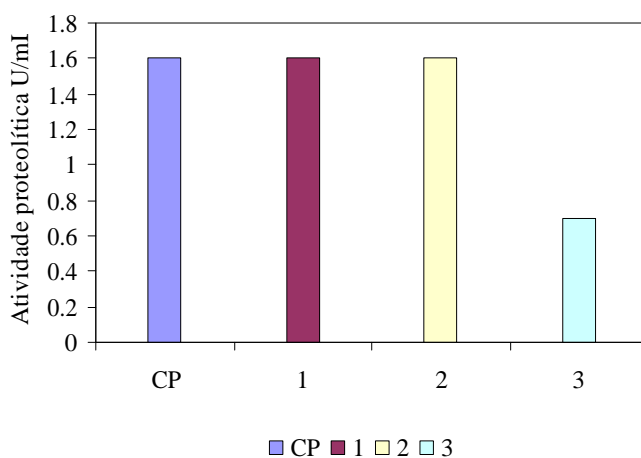


Figura 15. Valores de atividade enzimática do extrato bruto produzido a 40°C e testado a 25°C na condição sem agitação. Os tratamentos são: CP = papaína em tampão Tris-HCl pH 7,6; 1 = (1:1) de extrato bruto : água destilada, sendo (14mL: 14mL); 2 = (1:10) e 3 = (1:100).

Os resultados apresentados na figura 15 indicaram que os tratamentos 1 e 2 tem o mesmo valor de atividade, assim escolheu-se o tratamento 2 para o teste final do efeito do extrato bruto enzimático sobre as peles inteiras do tambaqui.

5.4.3 Determinação da atividade específica enzimática quantitativa do extrato bruto de *C. luteola* em 1h

Tabela 5. Valores de proteínas totais, atividade enzimática, atividade específica e rendimento.

tratamentos	Proteínas Totais mg/mL	U/mL	Atividade específica U/mL	Rendimento %
Extrato bruto	7,3	2,14	3,40	100%
1	3,6	1,62	2,3	75,70
2	0,73	1,61	0,45	75,20
3	0,073	0,6	0,12	28,04

CP = controle positivo (papaína preparada em tampão Tris -HCl pH 7,6); tratamento 1 = (1:1); tratamento 2 = (1:10); tratamento 3 = (1:100); Atividade específica = proteínas totais/atividade proteolítica quantitativa; rendimento = a atividade do extrato bruto é o 100%

5.4.3.1 Avaliação sensorial do extrato bruto de *C. luteola* em 1h

A avaliação sensorial apresentada na figura 16 foi determinada sobre os fragmentos de tambaqui. Os fragmentos sofreram a ação dos tratamentos CP= papaína em tampão Tris-HCl pH 7,6; 1 = (1:1) de extrato bruto: água destilada, sendo (14mL: 14 mL); 2 = (1:10) e 3 = (1:100). Nesta avaliação participaram 3 julgadores treinados em curtimento de couro de peixe. Os julgadores deram as notas conforme a seguinte escala de pontos: A = ao raspar com a colher a escama sai com dificuldade; B = ao raspar com a colher a escama sai com pouca dificuldade; C = ao raspar com a colher a escama sai com uma certa facilidade; e D = ao raspar com a colher a escama sai com facilidade.

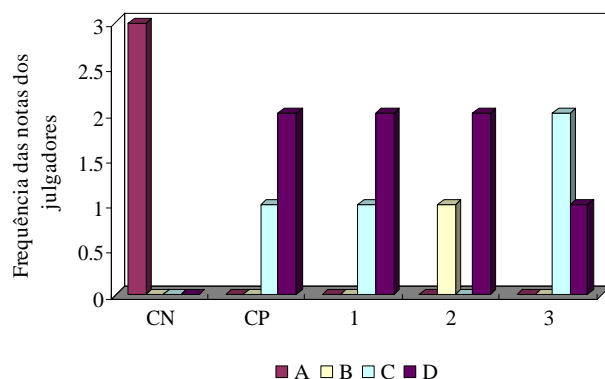


Figura 16. Avaliação sensorial sobre os fragmentos de pele de tambaqui que sofreram ação do extrato bruto durante 1h produzido a 40°C e testado a 25°C na condição sem agitação. Os tratamentos são: CN = água destilada (14mL); CP = papaína em tampão Tris-HCl pH 7,6; 1 = (1:1) de extrato bruto: água destilada, sendo (14 mL: 14 mL); 2n= (1:10) e 3 = (1:100). A nota atribuída aos fragmentos foi: A = ao raspar com a colher a escama sai com dificuldade; B = ao raspar com a colher a escama sai

A análise sensorial demonstrou que todos os julgadores atribuíram a nota A para o controle negativo; 67% a nota D e 33,33% a nota C ao tratamento 1; 67% a nota D e 33,33% a nota B ao tratamento 2; e 67% a nota C e 33,33% a nota D ao tratamento 3. (figura 15). Houve predomínio da nota D sobre o controle positivo e os tratamentos 1 e 2 demonstrando facilidade ao retirar a escama dos fragmentos de pele de tambaqui.

5.4.3.1.1 Avaliação da nota D atribuída pelos julgadores em comparação com a atividade enzimática do extrato bruto de *C. luteola* em 1h

Na figura 17 são apresentados os resultados comparativos entre a avaliação sensorial e a atividade proteolítica do extrato bruto de *C. luteola* sobre os fragmentos de pele de tambaqui que sofreram ação dos tratamentos: CN = água destilada (14mL); CP = papaína em tampão Tris-HCl pH 7,6; 1 = (1:1) de extrato bruto: água destilada, sendo (14mL: 14mL); 2 = (1:10) e 3 = (1:100) dando-se destaque ao resultado da avaliação sensorial da nota D que significa que ao raspar com a colher a escama sai com facilidade.

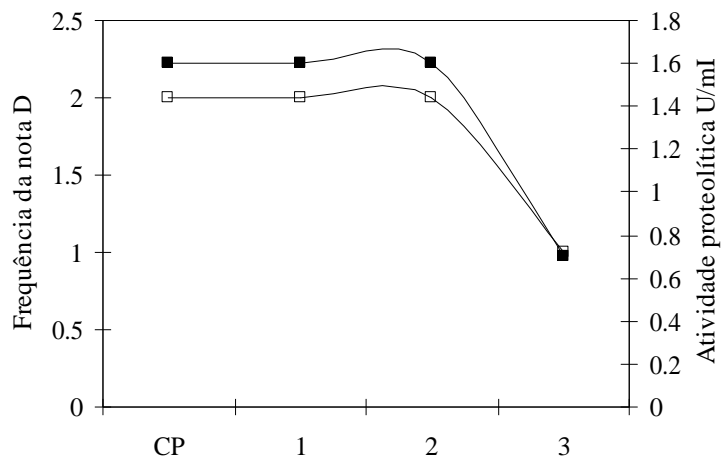


Figura 17. Comparativo da avaliação sensorial (□) e atividade proteolítica (■) sobre os fragmentos de pele de tambaqui que sofreram ação do extrato bruto produzido a 40°C e testado a 25°C na condição sem agitação durante 1h. Os tratamentos são: CN = água destilada (14mL); CP = papaína em tampão Tris-HCL pH 7,6; 1 = (1:1) de extrato bruto: água destilada, sendo (14mL: 14 mL); 2 = (1:10) e 3 = (1:100). A nota D = ao raspar com a colher a escama sai com facilidade.

Os resultados apresentados na figura 17 indicaram que os valores de atividade enzimática são iguais no controle positivo e nos tratamentos 1 e 2. No tratamento 3 ocorreu um decréscimo na frequência de julgadores e também na atividade enzimática porque o extrato bruto estava diluído 100 vezes. Estes resultados indicam que o extrato bruto diluído

(1:10) tem o mesmo efeito que o extrato bruto (1:1). Assim o tratamento B foi escolhido para ser utilizado na avaliação final do efeito do extrato bruto sobre as peles inteiras durante 1h.

5.5 Análises histológicas dos fragmentos de pele

Na figura 18 estão apresentados os resultados da análise histológica dos fragmentos de pele de tabaqui, os quais foram submetidos aos tratamentos: CN = água destilada (14mL); CP = papaína em tampão Tris-HCl pH 7,6; 1 = (1:1) de extrato bruto produzido a 40°C: água destilada, sendo (14mL: 14mL); 2 = (1:10) durante 1h a 25°C.

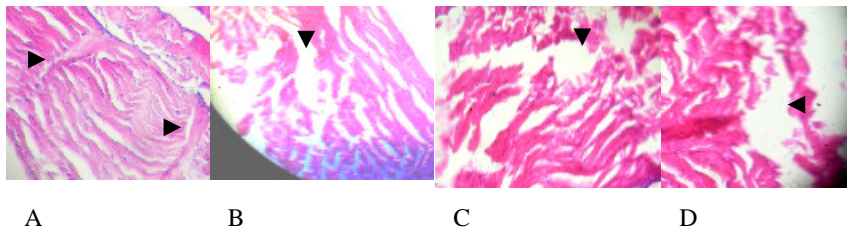


Figura 18. Histologia dos cortes dos fragmentos de peles coradas com Hematoxilina e eosina. A = controle negativo, tecido normal (40 x), fibras colágenas transversais (►); B = controle positivo solução de 0,02% papaína (40x), ação da papaína sobre as fibras do tecido conjuntivo (▼); C = tratamento 2, ação do extrato bruto sobre as fibras do tecido conjuntivo (▼) (40 x); D = tratamento 2, ação do extrato bruto sobre as fibras do tecido conjuntivo (◄) (40 x).

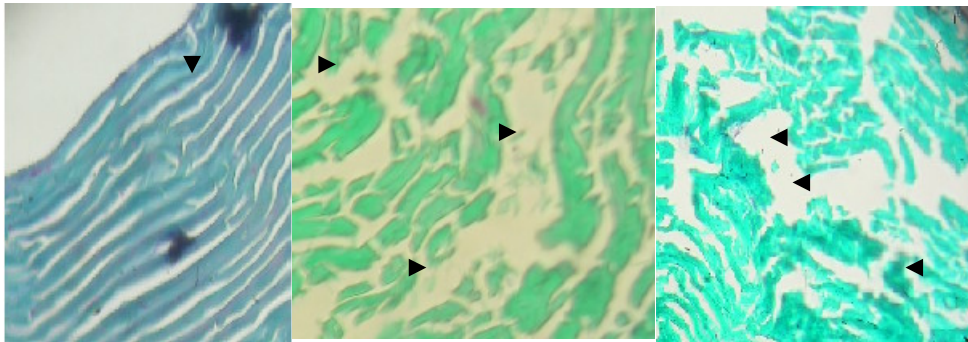


Figura 19. Histologia dos fragmentos coloração para tecido conjuntivo com Tricrômico de Masson. A = controle negativo com água destilada (▼fibras colágenas do tabaqui intactas) (40x); B = controle positivo com solução de papaína 0,02% preparada em tampão Tris-HCl pH 7,6 (►espaços deixados entre as fibras colágenas do tabaqui pela ação da papaína) (40x); C = tratamento 2 (1:10)/extrato bruto enzimático: água destilada (◄ espaços deixados nas fibras colágenas do tabaqui pela ação do extrato bruto enzimático de *C. luteola*) (40x) .

Os resultados da análise histológica dos fragmentos de pele do tabaqui quando

comparados com a literatura de Souza *et al.* (2003) indicaram que a derme do tambaqui é semelhante à derme da piraputanga *Brycon hilarii* (Valenciennes, 1850). Sendo dividida em duas camadas: uma superficial ou frouxa subjacente à epiderme, composta por fibras colágenas e outra camada mais profunda (derme compacta) com fibras colágenas mais espessas e paralelas a superfície. Em alguns pontos da derme compacta podem ser observadas fibras colágenas no sentido transversal (Souza *et al.*, 2003).

As peles analisadas foram previamente congeladas, processo comumente realizado para a preservação das peles antes do processo de curtimento (Rebello, 2002). As peles após passarem pelos tratamentos com a água, papaína 0,02% preparada em tampão Tris-HCl pH 7,6 e com os tratamentos 1, 2 e 3 com extrato bruto diluído (extrato bruto diluído x água destilada nas proporções 1 = (1:1); 2 = (1:10) e 3 = (1:100) foram preservadas em formol 10% e coradas com hematoxilina e eosina.

Como foram observadas alterações na arquitetura das fibras colágenas semelhantes àquelas ocorridas nas peles tratadas com papaína. Conforme está apresentado na figura 18 (b) para o controle positivo e 18 (c) para o extrato bruto de *C. luteola*, com coloração com hematoxilina e eosina, e de acordo com a figura 19 com coloração de tricrômico de Masson visualizando-se as fibras colágenas do controle positivo 19 (b) e 19 (c) para o extrato bruto de *C. luteola*. Dessa forma podemos constatar que provavelmente estas alterações sejam devido a ação das proteases presentes no extrato bruto.

5.5.1 Efeito da protease do extrato bruto de *C. luteola* produzido a 40°C e testado a 25°C

Neste experimento final as peles inteiras de tambaqui sofreram ação do extrato bruto de *C. luteola* produzido nas condições (40°C, 150rpm por 24h) e testado nas condições (sem agitação a 25°C). Foram utilizadas nove peles em cada tempo, uma para o controle negativo, outra para o controle positivo e sete peles para o tratamento 2 totalizando 18 peles nos dois tempos. O peso total das peles limpas e prontas para a etapa inicial do curtimento, o remolho, para o tempo de 1h foi 123,72g e para o tempo de 2h foi 92,82g. As peles inteiras foram imersas nos tratamentos: CN = controle negativo (água destilada); CP = controle positivo (solução de papaína a 0,02% preparada tampão Tris-HCl em pH 7,6); tratamento 2 = (1:10), extrato bruto: água destilada durante 1h e 2h.

5.5.1.1 Dosagem de proteínas totais do extrato bruto de *C. luteola*

Para a realização do experimento foi padronizada a quantidade de proteínas totais do

extrato bruto produzido nas condições (40°C, 150rpm por 24h). De acordo com Lowry *et al.* (1951) o extrato bruto de *C. luteola* apresentou 2,85mg/mL de proteínas totais. A quantidade 1mg de proteínas totais correspondeu a 0,35mL. Neste estudo fizeram-se os tratamentos: CN = água destilada ; CP = papaína em tampão Tris-HCl pH 7,6; tratamento 2 = (1:10).

5.5.1.2 Avaliação sensorial das peles inteiras de tambaqui sobre ação do extrato bruto de *C. luteola*

Os resultados da avaliação sensorial das peles de tambaqui que sofreram a ação do extrato bruto diluído (1:10) de *C. luteola* estão apresentados na figura 20. Esta avaliação foi realizada por 2 julgadores treinados em curtimento de pele de peixe. As notas atribuídas a ação do extrato bruto na remoção das escamas foram: A = ao raspar com a colher a escama sai com dificuldade; B = ao raspar com a colher a escama sai com pouca dificuldade; C = ao raspar com a colher a escama sai com uma certa facilidade; e D = ao raspar com a colher a escama sai com facilidade.

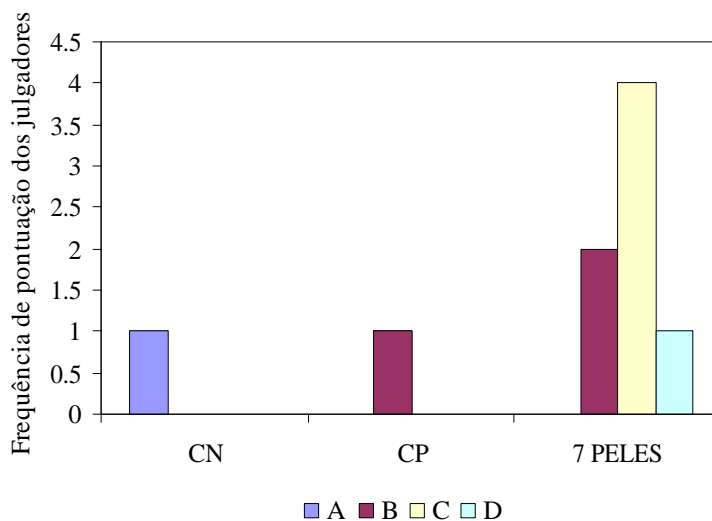


Figura 20. Avaliação sensorial das peles de tambaqui sob ação do extrato bruto de *C. luteola* produzido nas condições (40°C, 150 rpm, 24h) e testado a 25°C, nos tratamentos: CN = controle negativo (água destilada); CP = controle positivo (solução de papaína a 0,02% preparada tampão Tris-HCl em pH 7,6); tratamento 2 = (1:10), extrato bruto: água destilada durante 1h. Pontuação atribuída: A = ao raspar com a colher a escama sai com dificuldade; B = ao raspar com a colher a escama sai com pouca dificuldade; C = ao raspar com a colher a escama sai com uma certa facilidade; e D = ao raspar com a colher a escama sai com facilidade.

De acordo com a figura 20 em 1h de ação do extrato bruto de *C. luteola* sobre as peles o controle negativo recebeu a nota A, o controle positivo a nota B. Das sete peles 57,14%

obtiveram a nota C e 28,57% a nota B. Esta pontuação indicou que houve predomínio da remoção das escamas do tabaqui pelo extrato bruto de *C. luteola* com uma certa facilidade no tempo de 1h.

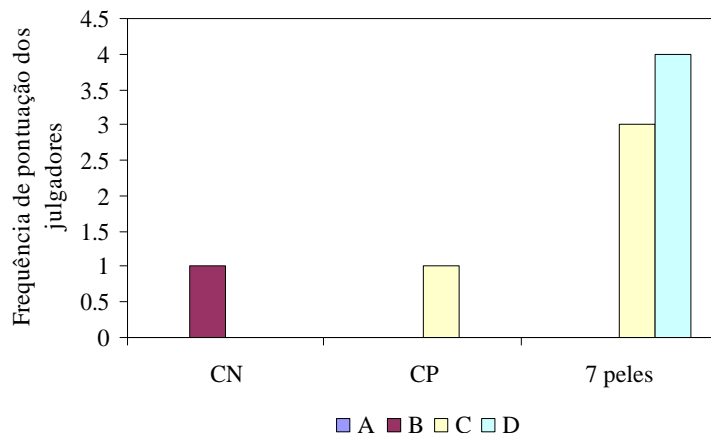


Figura 21. Avaliação sensorial das peles de tabaqui sob ação do extrato bruto de *C. luteola* produzido nas condições (40°C, 150 rpm, 24h) e testado a 25°C, nos tratamentos: CN = controle negativo (água destilada); CP = controle positivo (solução de papaína a 0,02% preparada tampão Tris-HCl em pH 7,6); tratamento 2 = (1:10), extrato bruto: água destilada durante 2h. Pontuação atribuída: A = ao raspar com a colher a escama sai com dificuldade; B = ao raspar com a colher a escama sai com pouca dificuldade; C = ao raspar com a colher a escama sai com uma certa facilidade; e D = ao raspar com a colher a escama sai com facilidade.

De acordo com a figura 21 em 2h de ação do extrato bruto de *C. luteola* sobre as peles o controle negativo recebeu a nota A, o controle positivo a nota B. Das sete peles 57,14 % obtiveram a nota D e 42,86 % a nota C. Esta pontuação indicou que houve predomínio da remoção das escamas do tabaqui pelo extrato bruto de *C. luteola* com facilidade no tempo de 2h.

6 DISCUSSÃO

6.1 Seleção dos isolados pela determinação da atividade proteolítica qualitativa

Na Amazônia foram realizados estudos sobre a atividade proteolítica qualitativa de 197 espécies de fungos dos gêneros *Aspergillus* e *Penicillium*. Os autores inocularam os extratos brutos enzimáticos em “cup-plate” de 8mm de diâmetro, na superfície do ágar gelatina-leite, modificado. Após 18h verificaram a reação enzimática positiva pelo aparecimento de um halo translúcido indicativo de atividade proteolítica positiva. Constataram que 71,72% (142) espécies tiveram reação proteolítica positiva (Teixeira *et al.*, 1996). Moreira *et al.*, (2004) utilizando a técnica de cup plate e o agar gelatina leite-modificado de 50 amostras de leveduras da Amazônia verificaram que 98% (49) expressaram halo de atividade proteolítica positiva.

Neste estudo utilizando-se a mesma técnica foram obtidos 172 isolados bacterianos do trato digestivo do tambaqui. Foi testada a atividade proteolítica do extrato bruto, e desses 69,77% (120) eram proteolíticos expressando halo indicativo de atividade proteolítica positiva. Santos *et al.* (2007), na Amazônia estudaram a atividade proteolítica do extrato bruto da bactéria *Bacillus* sp. isolada de solos da Amazônia. Eles utilizaram a técnica de cup plate e o agar gelatina leite-modificado e constataram que dos 30 isolados, todos expressaram halo.

6.2 Extração e caracterização físico-química da gelatina da pele do tambaqui

Choi & Regenstein (2000) encontraram valores de pH para gelatina de peixe variando de pH 4,2 a pH 6,5. Neste estudo o pH da gelatina obtida da pele do tambaqui foi pH 4,0.

A composição química centesimal da gelatina da pele dos peixes mapará *H. edentatus* e piramutaba *B. vaillanti* obtidos da pesca em Manaus foi de 66% e 68% de proteína; 14% e 14,8% de umidade; 0,3% e 0,4% de lipídeos; 2% e 0,04% de cinzas; e 8,8% e 7,7% de carboidratos respectivamente Da Silva (2004). Nesse trabalho a composição química

centesimal da gelatina da pele do tambaqui apresentou a porcentagem 68,20% de proteínas; 29,54% de umidade; 0,30% de lipídeos; 0,53% de cinzas e 2,31% de carboidratos.

Jamilah (2002) encontrou valores de 7,81% para a gelatina preparada a partir da pele de tilápia vermelha *Oreochromis nilotica*. E Gomes-Guillén (2002) 7,4% para a gelatina obtida a partir da pele de bacalhau *Gadus morhua*.

O rendimento da gelatina de mapará e piramutaba foi 4,56% e 3,01% respectivamente (Da Silva, 2004). Este autor obteve o rendimento através da pesagem das peles obtendo o percentual de gelatina de cada espécie. Nesse estudo o rendimento de gelatina liofilizada preparada a partir da pele do tambaqui foi 14% sobre 1kg de gelatina líquida filtrada. Provavelmente este valor superior tenha sido porque este rendimento foi calculado a partir da proporção (peso da gelatina líquida filtrada: peso da gelatina liofilizada).

6.3 Seleção dos isolados pela atividade proteolítica quantitativa

Neste estudo, os extratos brutos de 65 isolados selecionados pela atividade proteolítica quantitativa apresentaram valores de 0,05U/mL a 1,18U/mL. Santos *et al.* (2004) estudando a atividade de 16,67% (5) extratos brutos de *Bacillus* sp. da Amazônia referentes aos maiores valores de atividade proteolítica quantitativa verificaram que a 37°C os valores de atividade variaram de 0,27U/mL a 0,47U/mL.

6.4 Seleção dos isolados pela atividade colagenolítica qualitativa

Neste estudo dos 65 extratos brutos selecionados pela atividade proteolítica quantitativa, três isolados (4,62%) apresentaram os maiores valores que variaram de 0,05U/mL a 1,18U/mL. Os três isolados apresentaram atividade colagenolítica positiva testada em agar colágeno leite. MacLennan *et al.* (1953) verificaram que as espécies de bactérias: *Clostridium perfringens*; *C. histolyticum*; *Staphylococcus aureus*; *Streptococcus pyogenes*; *Bacillus*; bactérias da subfamília Enterobacteriaceae (*Proteus vulgaris*; *E. coli*; *Myxobacteria* sp.) apresentaram atividade colagenolítica.

Waldvogel & Swartz (1969) verificaram a atividade colagenolítica de bactérias aeróbias e constataram que apenas *S. aureus* apresentou atividade colagenolítica positiva representando 1% do total. Neste estudo também os autores verificaram que das bactérias anaeróbias apenas *C. tetani*, *Bacterioides* sp. e *Bacillus melaninogenicus* foram detectadas atividades colagenolíticas, sendo 8,82% do total. Neste estudo foi determinado a atividade colagenolítica apenas dos três últimos isolados escolhendo-se um isolado para o experimento final e posterior identificação.

6.5 Identificação dos isolados

6.5.1 *Chryseomonas luteola*

Atualmente a bactéria do gênero *Chryseomonas* consta de uma única espécie, *C. luteola* conhecida previamente como *Chromobacterium typhiflavum*, grupo Ve-1 do Centro de Controle de doenças, nos Estados Unidos; *Pseudomonas luteola* e *P. polytrichia*. Sua posição taxionômica foi definida em 1987 no gênero *Chryseomonas* (Holmes *et al.*, 1987). A *C. luteola* pertence à subfamília Pseudomonadaceae é um isolado clínico raro. Em um estudo clínico durante o período de dois anos foram encontrados apenas 14 cepas de *C. luteola* entre 565 isolados não fermentadores (Pedersen *et al.*, 1970).

Em um estudo realizado em 20 universidades de Valência, Espanha foram analisadas 370 amostras de alimentos crus e prontos para comer, como: alface, carne suína, bovina, frango e molho de tomate espanhol. Foi detectada alta incidência das bactérias: *Citrobacter freundii*; *C. luteola*; *Enterobacter cloacae*; *E. sakazakii*; *Klebsiella pneumoniae*; *K. oxytoca*; *K. ozaenae*; *Moraxella* spp. e *Serratia odorifera*. A *C. luteola* em num total de 40 alfaces cruas representou 15% da microbiota, e num total de 40 alfaces prontas para comer 2,5%. No entanto ela não foi encontrada em bife de suíno, bovino, frango e no molho de tomate espanhol tanto crus como prontos para comer (Soriano *et al.*, 2001). A *C. luteola* foi declarada a bactéria deterioradora de sucos vegetais pasteurizados crescendo em vegetais estocados após

a colheita preservados em temperaturas de 0°C a 10°C (Membre & Ubascka, 1998).

Neste estudo foi realizada uma seleção dos isolados considerando-se as atividades enzimáticas qualitativas e quantitativas proteolíticas. Não foi possível verificar a porcentagem desta espécie dentre a microbiota do trato gastrointestinal do *C. macropomum*, no entanto este foi o primeiro registro de *C. luteola* em pescados na Amazônia.

6.5.2 *Brevundimonas vesiculares*

Em estudos com rações para o salmão, *Salmo salar*, em tanques de criação no Chile foi verificada a porcentagem da microbiota resistente ao antibiótico oxitetraciclina. Foi encontrada *B. vesiculares* na quantidade de 3,90% na microbiota bacteriana não fermentadora nas amostras de “pellets” de ração. A *B. vesicularis* foi capaz de crescer em ágar TSA suplementado com 30Ug/mL de oxitetraciclina (Miranda & Zemelman, 2002).

Em outro estudo foi verificado que a *B. vesiculares* isolada de solos é produtora de astaxantina. (Tao *et al.*, 2006). A astaxantina é um carotenóide comum presente em peixes marinhos e moluscos (Miki *et al.*, 1982). Este carotenóide tem sido amplamente usado como suplemento para a alimentação de aves e na aquicultura e também atua como um forte antioxidante (Nishikawa *et al.*, 2005).

Neste estudo o extrato bruto enzimático de *B. vesiculares* foi selecionado pelas técnicas de detecção das atividades enzimáticas proteolíticas qualitativas e quantitativas. Não foi possível verificar a porcentagem desta espécie dentre a microbiota do trato gastrointestinal do *C. macropomum*, no entanto, este foi o primeiro registro de *B. vesiculares* em pescados da Amazônia.

6.6 Características cinéticas do extrato bruto enzimático de *C. luteola*

Neste estudo a *C. luteola* obtida do trato gastrointestinal do tambaqui foi isolada na temperatura de 37°C a 150rpm e obteve sua atividade proteolítica do extrato bruto nas mesmas condições em que foi isolada com o substrato azocazeína 1% preparada em tampão

Tris-HCl pH 7,2. Foi verificado que no pH ótimo de 7,2 o extrato bruto no tempo de 90 minutos obteve uma atividade residual de 120%. Esta atividade residual provavelmente foi devida ao uso do indutor de atividade, a gelatina comercial inserida na solução de Manachini, meio o qual foi introduzido o inoculo na escala de Macfarland 1 para posterior obtenção do extrato bruto mediante filtração.

Nestas condições a atividade proteolítica obtida do extrato bruto de *C. luteola* foi 100% com 4,01U/mL. Neste estudo testando-se o extrato bruto em diferentes temperaturas de 25°C a 80°C foi verificado que a máxima atividade foi obtida na faixa de temperatura ótima de 70°C e 80°C. A 70°C a atividade residual em 90 minutos foi de 166% indicativo de que a enzima presente no extrato bruto é termoestável. O decréscimo a 80°C na atividade residual para 26% restringe o seu limite até 70°C. Da mesma forma que a temperatura é indicativo de termoestabilidade os valores de pH indicaram que as proteases do extrato bruto de *C. luteola* são alcalinas porque apresentaram atividade em valores de pH de 8 e 10 além da faixa de pH ótimo.

Estas características indicam que o extrato bruto de *C. luteola* é composto por proteases alcalinas e termoestáveis. As proteases alcalinas são ativas em pH de 8 a 13 (Porto *et al.*, 1996), e aquelas na faixa de temperatura de 65°C a 85°C são termoestáveis (Haki & Rakshit, 2003). No entanto, enzimas termoestáveis são estáveis e ativas em temperaturas mais altas do que as temperaturas ótimas de crescimento dos microrganismos que as contém (Saboto *et al.*, 1999).

Assim, as proteases do extrato bruto de *C. luteola* são alcalinas e termoestáveis. Todos os componentes celulares de organismos termofílicos como: enzimas, proteínas e ácidos nucléicos são também termoestáveis (Haki & Rakshit, 2003).

Estas características quanto à termoestabilidade corroboram com as características das enzimas que têm aplicação em indústrias de cerveja, detergentes e couro (Haki & Rakshit,

2003). E no ramo das indústrias de couro, as recentes tendências e progressos biotecnológicos indicam que as enzimas utilizadas na fase de abertura das fibras são proteases alcalinas (Tanikaivelan *et al.*, 2004).

A fase de abertura das fibras ocorre no caleiro e na purga, etapas preparatórias onde às peles são preparadas para o curtimento e o pH do caleiro varia de pH 11,5 a pH 12,5 (Rebello, 2002). No entanto, o caleiro para remoção de pêlos bovinos com proteases alcalinas ocorre na faixa de pH 8 a 10 (Horikoshi, 1999).

Sharmin & Rahman (2007) isolaram das fezes de cachorro a bactéria do gênero *Bacillus* serie FS-1 e produziram o extrato bruto nas condições de temperatura e pH ótimos de 50°C e 8,5 respectivamente. Identificaram uma metaloprotease que foi capaz de eliminar pêlos da pele bovina. Najafi *et al.* (2005) produziram o extrato bruto de *Pseudomonas aeruginosa* nas condições ótimas de temperatura de pH de 50°C e 8 respectivamente, e verificaram que após 2h30 minutos e 3h os pêlos da pele bovina foram eliminados com facilidade.

Quando se usam enzimas na desencalagem o pH varia de 8,0 a 8,5 e na purga o pH para o processo ocorre entre 7,5 a 8,5 (Rebello, 2002). Assim as proteases alcalinas são utilizadas desde a desencalagem até a purga em substituição de produtos químicos poluidores.

O extrato bruto de *C. luteola* é composto por proteases alcalinas com pH e temperaturas ótimos de 7,2 e 70°C - 80°C respectivamente, ele apresentou estabilidade da atividade enzimática no pH 8 até 30 minutos e em pH 9 entre 30 minutos e 60 minutos, porém a 37°C e a 70°C a estabilidade ocorreu até 90 minutos. Além da termoestabilidade enzimática as proteases do extrato bruto de *C. luteola* degradaram colágeno (figura 4). Portanto as proteases alcalinas e termoestáveis do extrato bruto de *C. luteola* têm potencial colagenolítico para serem utilizadas na indústria de couro desde a fase de remolho, caleiro, desencalagem e purga.

A faixa adequada de pH para os processos de remolho; caleiro; desencalagem e purga são: pH 6,0 a 7,0; pH 11,5 a 12,5; pH 8,0 a 8,5; e pH 7,5 a 8,5 respectivamente. Estes são processos preparatórios para o curtimento de peles de peixes onde são utilizados produtos químicos e enzimas de origem bovina. Apesar do pH do caleiro variar na faixa de 11,5 a 12,5 (Rebello, 2002).

O pH para eliminar pêlos com proteases alcalinas varia na faixa de 8 a 10 (Horikoshi, 1999; Najafi *et al.*, 2005). Assim o extrato bruto de *C. luteola* pode ser testado na etapa do caleiro ou remoção das escamas. E apesar dos estudos cinéticos revelarem a temperatura e pH ótimos, o estudo da curva de crescimento de *C. luteola* a 37°C/24h indicou uma atividade do extrato bruto de 12,67U/mL em um pH de 7,6. Este novo estudo serviu de base para serem realizados às atividades finais do extrato bruto em pH 7,6. No entanto, apesar das enzimas termoestáveis serem estáveis e ativas em temperaturas mais altas do que as temperaturas ótimas de crescimento dos microrganismos que as contém (Saboto *et al.*, 1999), tornou-se necessário conhecer a temperatura ótima de crescimento do microrganismo e atividade do extrato bruto enzimático. Neste estudo o crescimento ótimo ocorreu a 40°C.

6.7 Experimentos finais: testes com o extrato bruto

6.7.1 Seleção do tratamento com e sem agitação a partir do extrato bruto de *C. luteola* produzido a 25°C e aplicado no caleiro a 25°C

O curtimento de peles de peixes pode ocorrer calculando-se a quantidade dos produtos químicos sobre o peso ou volume de água que cobre as peles nas condições com e sem agitação. A agitação realizada em fulões necessita de energia elétrica e mantém as peles em movimentos descontínuos sendo este o processo realizado atualmente (Rebello, 2002).

Nesta etapa foram definidos, previamente, pelo teste de ANOVA para dois fatores a condição e tempo ideais para o estudo. A condição sem agitação foi escolhida, independente do resultado estatístico, pelo motivo de realizar-se um caleiro com baixo custo de energia com

o processo de curtimento estático, em baldes. E em relação ao tempo o resultado estatístico foi escolhido, porque, o caleiro realizado em 1h acelerou o processo.

6.7.1.1 Avaliação sensorial

Na avaliação sensorial, apesar de que no decorrer dos tempos (1h; 2h e 3h) aumentou a facilidade da remoção das escamas, no tempo escolhido de 1h e na condição sem agitação, a avaliação sensorial apresentou resultados satisfatórios tendo 83,33% dos julgadores facilidade em remover as escamas.

6.7.1.2 Experimento do efeito do extrato bruto de *C. luteola* produzido a 40°C e testado a 25°C sobre pedaços de pele de tambaqui para verificar a remoção das escamas

Neste estudo as escamas da pele de *C. macropomum* foram removidas em 1h utilizando-se somente o extrato bruto de *C. luteola*. O extrato bruto de *C. luteola* composto por proteases alcalinas apresentou uma atividade específica de 3,4 U/mL.

Moreira *et al.*, (2003) estudaram as potencialidades do extrato bruto de *Nocardiosis* sp., um actinomiceto aeróbio e verificaram que este pode ser utilizado na indústria de detergentes. A dosagem das proteínas totais deste extrato bruto apresentou a proporção (0,15mg/mL). Esse extrato bruto era composto de proteases alcalinas com temperaturas e pH ótimos de 50°C e 10,5 respectivamente. Nesse estudo o extrato bruto apresentou uma atividade específica de 20U/mg.

O extrato bruto de *C. luteola* apresentou uma atividade específica 17% da atividade de *Nocardiosis* sp. e o extrato bruto foi utilizado na etapa de remoção das escamas equivalente a etapa de depilação ou caleiro nas peles bovinas.

Najafi *et al.* (2005) produziram o extrato bruto de *Pseudomonas aeruginosa* nas condições ótimas de temperatura de pH de 50°C e 8 respectivamente, e verificaram que após 2h30 minutos e 3h os pêlos da pele bovina foram eliminados com facilidade. Neste estudo o

extrato bruto apresentou uma atividade específica de 7U/mg, portanto 48,57 % superior a do extrato bruto de *C. luteola*.

No passado a operação de retirada dos pelos de pele bovina era realizado com as fezes realizando-se a remoção dos pelos por proteases endógenas como a tripsina pancreática bovina. Atualmente estes processos são tradicionalmente realizados com proteases alcalinas de origem microbiana usadas juntamente com o óxido de cálcio e sulfeto de sódio (Rao *et al.*, 1998).

Dayanandan *et al.* (2003) utilizaram o extrato bruto contendo proteases alcalinas do fungo *Aspergillus tamarii* isolados de solos para a depilação de pele caprina. Os autores removeram os pelos utilizando uma faca sem fio aplicando o extrato bruto nas temperaturas de 26°C; 30°C; e 37°C por 24h. Também foram utilizadas diferentes concentrações das enzimas, de modo que com 0,5 a 2% (p/p) usando apenas o extrato bruto não ocorreu uma boa depilação, porém com 1% (p/p) foram obtidos melhores resultados sendo a depilação realizada em 18h. No entanto, usando-se 0,5% (p/p) de enzima e 1% de sulfeto ocorreu a completa depilação da pele de cabra. Neste estudo utilizando o extrato bruto de *C. luteola* houve a remoção das escamas de *C. macropomum* em 1h sem adição de sulfeto de sódio e do óxido de cálcio.

6.7.1.2.1 Avaliação sensorial do extrato bruto produzido a 40°C e testado a 25°C, em 1h sem agitação

Neste experimento houve predomínio da nota D sobre o controle positivo e os tratamentos 1 e 2 demonstrando facilidade ao retirar a escama dos fragmentos de pele de tambaqui. Estes resultados coincidiram com os valores de atividade enzimática de 1,62U/mL e 1,61U/mL, respectivamente. Assim foi escolhido o tratamento 2 para avaliar o efeito do extrato bruto sobre as peles inteiras durante 1h (figura 16).

6.8 Análises histológicas dos fragmentos de pele com extrato bruto produzido a 40°C e testado a 25°C, em 1h sem agitação

O padrão da derme profunda do tambaqui *C. macropomum* encontrado neste estudo através de técnicas histológicas quando comparado com a literatura é semelhante à derme profunda da piraputanga *Brycon hilarii*, sendo esta característica muito comum segundo Junqueira *et al.* (1983) para a pele dos peixes.

A pele dos teleósteos é constituída por epiderme e derme. A derme fica apoiada na hipoderme que é composta de células adiposas entremeadas por tecido conjuntivo frouxo (De Souza, 2003). Cortando-se transversalmente a pele é possível observar nitidamente duas camadas principais: uma camada superior ou epiderme e outra camada inferior localizada abaixo da epiderme, a derme ou córion, a qual é transformada em couro (Rogers, 1953). As peles de peixes apresentam uma epiderme delgada com escamas e ausência de glândulas sebáceas (De Barros *et al.*, 1998).

Nesse estudo a facilidade da remoção das escamas sobre os pedaços de pele demonstrada pelo predomínio de nota D é comprovada com as análises histológicas pela alteração na arquitetura das fibras colágenas através da coloração com o tricrômico de Masson.

Assim o extrato bruto, diluído 10 vezes, composto por proteases alcalinas termoestáveis produzido a 40°C e testado a 25°C em fragmentos de pele de 6cm² foi testado na etapa do caleiro ou remoção de escamas, em processo estático e provocou alterações na arquitetura das fibras colágenas facilitando a remoção das escamas em 1h. Estes resultados foram refletidos quando foi utilizado o mesmo extrato bruto sobre as peles inteiras, onde 57,14% dos julgadores atribuíram à nota C em 1h de exposição, e 57,14 % a nota D em 2h de exposição. A atribuição da nota C do efeito do extrato bruto diluído 10 vezes sobre as peles inteiras em 1h de exposição comprovou que as escamas foram removidas com certa facilidade

e que pode para melhorar este processo deixar as peles expostas por mais 1h para obter a remoção com facilidade semelhante à nota D atribuída sobre os pedaços de pele de 6 cm².

7 CONCLUSÕES

- A bactéria selecionada pela atividade proteolítica qualitativa e quantitativa para a caracterização das proteases do extrato bruto utilizado na etapa de remoção das escamas da pele do *C. macropomum* foi a *Chryseomonas luteola*;

- A *C. luteola* produziu um extrato bruto composto por proteases alcalinas e termoestáveis com estabilidade das proteases a 70°C durante 90 minutos;

- A *C. luteola* produziu um extrato bruto com pH e temperaturas ótimos de 7,2 e 70°C a 80°C produzindo também uma alta atividade nas condições de pH e temperatura de 7,6 e 37°C de 12,67U/mL;

- O extrato bruto de *C. luteola* degradou o colágeno a 37°C *in vitro*;

- O extrato bruto da *C. luteola* produzido a 40°C e testado a 25°C foi capaz de remover as escamas dos fragmentos de pele de 6cm² do tambaqui *C. macropomum* com uma atividade enzimática média de 1,6U/mL;

- Os resultados da avaliação sensorial indicaram que 67% dos julgadores demonstraram que houve remoção das escamas com facilidade em ambos os tratamentos: papaína 0,02% e nos extratos brutos diluídos 1 e 10 vezes;

- As análises histológicas indicaram que o extrato bruto diluído 1 e 10 vezes produziu alterações na arquitetura das fibras colágenas semelhantes às alterações produzidas pela papaína a 0,02%.

- O extrato bruto de *C. luteola* composto por proteases alcalinas termoestáveis tem potencial para degradar colágeno, *in vitro*. E, quando diluído 10 vezes, em 1h de exposição sobre fragmentos de pele de 6cm² obteve a capacidade de remover escamas com facilidade e alterar a arquitetura das fibras colágenas comprovado pelas análises histológicas. E, agindo sobre as peles inteiras removeu com certa facilidade as escamas da pele em 1h de exposição e com facilidade em 2h.

8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Araujo-Lima, C.A.; Goulding, M. 1998. *Os frutos do tabaqui: ecologia, conservação e cultivo na Amazônia*. CNPq. Sociedade Civil Mamirauá, Tefé, Brasil. 186pp.
- Adolfo, L. 1985. *Normas analíticas do Instituto Adolfo Lutz I. Métodos químicos e Físicos para Análise de Alimentos*. 3ª ed., Secretaria do Estado de Saúde. São Paulo. 533pp.
- Association of official analytical chemistry. AOAC. 1990. *Official methods of analysis*. 15ª ed. Washington, Washington, USA. 960pp.
- Almeida, N.M. 1998. *Alterações post-mortem em Colossoma macropomum (Cuvier, 1818), procedentes da piscicultura, e conservados em gelo*. Dissertação de Mestrado. Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia, Universidade Federal do Amazonas. 89pp.
- Bobbio, P.A.; Bobbio, F.O. 2001. *Química de processamento de alimentos*. 3ª.Ed. São Paulo, São Paulo, Brasil. 143pp.
- Brody, J. 1965. *Fishery by-products technology*. AVI Publishing, New Jersey, USA. 232pp.
- British Standards Institution. B.S.I. 1975. *Methods for sampling and testing gelatin (physical and chemical methods)*. London, UK. 130pp.
- Cardoso, R.S. 2001 *Caracterização da aquíicultura no Estado do Amazonas*. Monografia de graduação. Departamento de ciências pesqueiras, faculdade de ciências agrárias, Universidade Federal do Amazonas. 80pp.
- Choi, S.S.; Regenstein, J.M. 2000. Physicochemical and Sensory Characteristics of Fish Gelatin. *Journal Food Science*, 65: 194-99.
- Dayanandan, A.; Kanagaraj, J.; Sounderraj, L.; Govindaraju, R.; Rajkumar, G.S. 2003. Application of an alkaline protease in leather processing: an ecofriendly approach, *Journal of Cleaner Production*, 11: 533-536.
- Da Silva, I.A.A. 2004. *Caracterização físico-química das gelatinas obtidas das peles da piramutaba (Brachyplatystoma vaillantii) e do mapará (Hypophthalmus edentatus)*.

- Dissertação de Mestrado. Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia. Universidade do Amazonas. Manaus, Amazonas, 76pp.
- De Barros, M.A.S.; Arroyo, P.P.A.; Souza-Aguiar, E.F. 1998. O processamento de peles. <http://www.google.com.br>. Acesso em: 18 fev 2005.
- Gomez-Guillen, M.C.; Montero, P. 2001. Extraction of gelatin from megrim (*Lepidorhombus boscii*) skins with several organic acids. *Journal of Food Science*, 66: 213-216.
- Haki, G.D.; Rakshit, S.K. 2003. Developments in industrially important thermostable enzymes: a review. *Bioresource Technology*, 89:17-34.
- Hamm, R. 1963. The water inhibiting power of foods recent advances in food science. *Biochemistry and Biophysics in foods Research*, 40: 222-227.
- Hankin, L.; Anagnostakis, S. L. 1975. The use of solid media for detection of enzyme production by fungi. *Mycology*, 67: 597- 607.
- Hoinacki, E. 1989. *Peles e couros*. SENAI, Porto Alegre, Brasil. 319pp.
- Holmes, B.; Steigerwalt, A.G.; Weaver, R.E.; Brenner, D.J. 1987. *Chryseomonas luteola* comb. nov. and *Flavimonas oryzihabitans* gen. nov., comb. nov., *Pseudomonas*-like species from human clinical specimens and formerly known, respectively, as groups Ve-1 and Ve-2, *International Journal of Systematic Bacteriological*, 37: 245-250.
- Horikoshi, S.; Watanabe, N.; Onishi, H.; Hidaka, H.; Serpone, N. 2002. Photodecomposition of a nonylphenol polyethoxylate surfactant in a cylindrical photoreator with TiO₂ immobilized fiberglass cloth. *Applied Catalysis B: Environmental*, 37: 117-129.
- Jamilah, B.; Harvinder, K.G. 2002. Properties of gelatins from skins of fish – black tilapia (*Oreochromis nilotica*). *Food Chemistry*. 77: 81-84.
- Johnston-Banks, F.A. 1990. *Gelatin food gels*. Macmillan, New York, EUA. 289pp.

- Junqueira, L.C.U.; Joazeiro, P.P.; Montes, G.S.; Menezes, N.; Pereira, Filho, M. 1983. The collagen fiber architecture of Brazilian naked skin. *Brazilian Journal Medicinal Biological Research*, 16: 313-316.
- Kimura, S.; Kimura, T. 1982. The characterization of lamprey notochord collagen with special reference to its skin collagen. *Comparative Biochemistry Physiological*, 73: 331-340.
- Lessi, E.; Jesus, R.S.; Vianna, J.M.; Britto, E.N. 2000. Diagnóstico de la aplicación del sistema haccp en las industrias de procesamiento de pescado del estado de Amazonas-Brasil. v consulta de expertos sobre tecnología de productos pesqueros em América Latina. FAO, 10pp. (no prelo).
- Leighton, T.J.; Doi, R.H.; Warren, R.A.J.; Kellin, R.A. 1973. The relationship of serine protease activity to RNA polymerase modification and sporulation in *Bacillus subtilis*. *Journal of Molecular Biology*, 76: 103-122.
- Lowry, O. H.; Rosebrough, N.F.; Farr, A.L.; Randall, R.J. 1951. Protein measurement with the folin phenol reagent. *Journal of Biological Chemistry*, 193: 265-274.
- Luna, L.G. 1968. *Manual of histology staining methods of Armed Forces Institute of Pathology*. 3. McGraw-Hill Book, New York, USA. 257pp.
- MacLennan, J.D.; Mandi, I.; Howes, E.L. 1953. Bacterial digestion of collagen. *Journal Clinical Investigation*, 32: 1317-1322.
- Maeda L.S. 1998. *Diagnóstico da piscicultura na região de produção em torno de Manaus, Amazonas*. Monografia. Universidade do Amazonas. Manaus. 21pp.
- Moreira, K.A.; Porto, T.S.; Teixeira, M.F.S.; Porto, A.L.F.; Lima Filho, J.L. 2003. New alkaline protease from *Nocardiosis* sp.: partial purification and characterization. *Process Biochemistry*, 39: 67-72.

- Membré, J.M.; Kubackka, M. 1998. Degradation of peptic compounds during pasteurized vegetable juice spoilage by *Chryseomonas luteola*: a predictive microbiology approach. *International Journal Food Microbiological*, 42: 159-166.
- Merkel, J.R.; Dreisbach, J.H.; Henry, B.Z. 1975. Collagenolytic activity of some marine bacteria. *Applied Microbiology*, 5: 145-151.
- Miki, W.; Yamaguchi, K.; Konosu, S.1982. Comparison of carotenoids in the ovaries of marine fish and shellfish. *Composition Biochemistry Physiological*, 71: 7-11.
- Miranda, C.D.; Zemelman, R., 2001. Antibiotic resistant bacteria in fish from the Concepción bay, Chile. *Marine Pollution Bulletin*, 42: 1096-1102.
- Najafi, M.F.; Deobagkar, D.; Deobagkar, D. 2005. Potential application of protease isolated from *Pseudomonas aeruginosa* PD 100. *Eletronic Journal of Biotechnology*, 8: 197-202.
- Nishikawa, Y.; Minenaka, Y.; Ichimura, M.; Tatsumi, K.; Nadamoto, T.; Urabe, K. 2005. Effects of astaxanthin and vitamin C on the prevention of gastric ulcerations in stressed rats. *Journal Nutrition Science Vitaminological*, 51: 135-141.
- Pantoja, M.A. 2002. *Ocorrência de Aeromonas spp. em tambaqui Colossoma macropomum (Cuvier, 1818) resfriado e comercializado em supermercados e feiras de Manaus*. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal do Amazonas, Faculdade de Farmácia, Manaus, Amazonas. 59pp.
- Pedersen, M.M.; Marso, E.; Pickett, M.J. 1970. Nonfermentative bacilli associated with man: III. Pathogenicity and antibiotic susceptibility. *American Journal of Clinical Pathology*, 54: 178-192.
- Pihlajaniemi, T.; Rehn, M. 1995. Two new collagen subgroups: membrane-associated collagens and types XV and XVIII. *Progress in Nucleic Acid Research and Molecular Biology*, 50: 225-61.

- Porto, A.L.F.; Campos-Takaki, J.M.; Lima-Filho, J.L. 1996. Effects of culture conditions of protease production by *Streptomyces clavuligerus* growing soy bean flour medium. *Applied Biochemistry Biotechnology*, 60: 115-120.
- Rao, M.B.; Tanksale, A.M.; Ghate, M.S.; Deshpande, V.V. 1998. Molecular and Biotechnological Aspects of Microbial Proteases. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 40: 597-635.
- Rebello, J.J. 2002. *Transformação da pele de peixe da região amazônica em couro (com formulação química)*. Editora Silva, Manaus, Brasil. 63pp.
- Rogers, A. 1953. *Tratado completo de fabricación de cueros y pieles*. 2^a ed. Editora Ossó. Barcelona, Espanha. 44pp.
- Saboto, D.; Nucci, R.; Rossi, M.; Gryczynski, I.; Gryczynski, Z.; Lakowicz, J.; 1999. The b-glycosidase from the hyperthermophilic archaeon *Sulfolobus solfataricus*: enzyme activity and conformational dynamics at temperatures above 100 °C. *Biophysical Chemistry*, 81: 23–31.
- Sato, K.; Yoshinaka, R.; Sato, M.; Itoh, Y.; Shimizu, Y. 1988. Isolation of types I and V collagens from carp muscle. *Comparative Biochemistry Physiological*, 92: 155-8.
- Silva, C.M.A. 2001. *Bactérias Gram-negativas isoladas do tambaqui, Colossoma macropomum (Cuvier, 1818) criado em cativeiro, Amazonas-Brasil*. Dissertação de Mestrado. Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia, Fundação Universidade do Amazonas. 76pp.
- Silva, N.; Junqueira, V.C.A.; Silveira, N.F.A. 1997. *Manual de métodos de análise microbiológica de alimentos*. São Paulo, Brasil. 317pp.
- Sharmin, F.; Rahman, M. 2007. Isolation and Characterization of Protease producing *Bacillus* strain FS-1. *Agricultural Engineering International*, 9: 1-8.
- Shimokomaki, M.; Silva, L.C.; Miyamoto, S.; Kubota, E.H. 1993. Presence of new disulphide bonded collagens in shark *Prionace glauca*. *Comparative Biochemistry Physiological*, 106: 335-337.

- Soriano, J.M.; Rico, H.; Moltó, J.C.; Mañes, J. 2001. Incidence of microbial flora in lettuce, meat and Spanish potato omelets from restaurants. *Food Microbiology*, 18: 159-163.
- Souza, M.L.; Dourado, D.M.; Machado, S.D.; Buccini, D.F.; Jardim, M.I.A.; Matias, R.; Correia, C.; Ferreira, I.C. 2003. Análise da pele de três espécies de peixes: histologia, morfometria e testes de resistência. *Revista Brasileira de Zootecnia*, 32: 1551-1559.
- Tanikaivelan, P.; Rao, R.R.; Nair, B.U.; Ramasami, T. 2004. Progress and recent trends in biotechnological methods for leather processing. *Trends in Biotechnology*, 22(4): 181-188.
- Tao, L.; Schenzle, A.; Odom, J.M.; Cheng, Q. 2005. Novel carotenoid oxidase involved in biosynthesis of 4,4'-diapolycopene dialdehyde. *Applied Environmental Microbiology*, 71: 3294-3301.
- Teixeira, M.F.S.; Fernandes, O.C.C.; Herrera, A. M.; Duran, N. 1996. Determinação qualitativa de proteases: método de cup-plate modificado. *Revista Universidade do Amazonas*, 4/5: 39-45.
- Villanueva, J.M.H. 1986. *Elaboración de nuevos productos a base de porciones óseas y cartilagosas de pescado: colágenos*. Universidad Nacional de Piura. Perú. Facultad de Ingeniería Pesquera. Departamento Académico de Ciencias Biológicas. Lima. Perú. 16pp.
- Waldvogel, F.A.; Swartz, M.N. 1969. Collagenolytic Activity of Bacteria. *Journal of Bacteriology*, 50: 662-667.

This document was created with Win2PDF available at <http://www.daneprairie.com>.
The unregistered version of Win2PDF is for evaluation or non-commercial use only.

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)