



**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOCÊNCIA ANIMAL**

Obtenção de proteases por particionamento dos resíduos de Tainha (*Mugil liza*) visando sua aplicação biotecnológica

QUÉSIA JEMIMA DA SILVA

RECIFE

2022



**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOCÊNCIA ANIMAL**

Obtenção de proteases por particionamento dos resíduos de Tainha (*Mugil liza*) visando sua aplicação biotecnológica

QUÉSIA JEMIMA DA SILVA

Tese apresentada ao Programa de Pós Graduação em Biociência Animal da Universidade Federal Rural de Pernambuco - UFRPE, como pré requisito para obtenção do título de Doutora em Biociência Animal.

Orientação: Prof. Dra. Ana Lúcia Figueiredo Porto
Co-orientação: Prof. Dr. Vagne de Melo Oliveira

RECIFE

2022

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

S586o DA SILVA, QUESIA JEMIMA

Obtenção de proteases por particionamento dos resíduos de Tainha (Mugil liza) visando sua aplicação biotecnológica / QUESIA JEMIMA DA SILVA. - 2022.
106 f.: il.

Orientador: Profa. Dra. Ana Lucia Figueiredo Porto. Coorientador: Prof. Dr. Vagne de Melo Oliveira. Inclui referências.

Tese (Doutorado) - Universidade Federal Rural de Pernambuco, Programa de Pós-Graduação em Biociência Animal, Recife, 2022.

1. subprodutos; . 2. biocompostos; . 3. proteases; . 4. colagenases; . 5. purificação. I. Porto, Profa. Dra. Ana Lucia Figueiredo, orient. II. Oliveira, Prof. Dr. Vagne de Melo, coorient. III. Título

CDD 636.089

FOLHA DE APROVAÇÃO

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biociência Animal, como parte dos requisitos necessários à obtenção do grau de Doutor em Biociência Animal, outorgado pela Universidade Federal Rural de Pernambuco, à disposição na Biblioteca Central desta universidade. A transcrição ou utilização de trechos deste trabalho é permitida, desde que respeitadas as normas de ética científica.

Quésia Jemima da Silva

Data de aprovação / /

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. Ana Lúcia Figueiredo Porto – Presidenta
Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal/UFRPE

Profa. Dra. Juanize Matias da Silva Batista – Titular
Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal/UFRPE

Profa. Dra. Márcia Nieves Carneiro da Cunha – Titular
Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal/UFRPE

Profa. Dra. Raquel Pedroza Bezerra – Titular
Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal/UFRPE

Prof. Dr. Prof. Dr. Vagne de Melo Oliveira – Titular
Centro de ciências da saúde e do desporto/UFAC

Prof. Dr. Romero Marcos Pedrosa Brandão Costa – Suplente
Universidade de Pernambuco/UPE

AGRADECIMENTOS

À minha orientadora, Profa. Dra. Ana Lúcia Figueiredo Port, pela confiança, paciência, por ter aberto as portas do LABTECBIO para realização deste trabalho.

Ao meu co-orientador, Dr. Vagne Melo Olivera pelo incentivo à produção científica e pela oportunidade de fazer parte do grupo de pesquisa.

A coordenação de Pós Graduação em Biociência Animal, na pessoa da Profa. Dra. Tatiana Porto e o Prof. Dr. Rinaldo Mota por sempre estarem disponível e pelo acolhimento aos discentes.

Aos meus colegas do grupo de pesquisa Bioquímica de Pescados, Jéssica, Bia, Sabrina, Nairane, Nilson, Luiz e aos que passaram e deixaram sua contribuição como o Gabriel e o Felipe.

Agradeço especialmente a Jéssica, pela paciência, carinho e amizade nesta reta final.

Minha eterna gratidão aos colegas de LABTECBIO Vivi, Steliane, Karol, João, José Noé, Pri Calaça, Elaine, Katlen, Miller, Túlio levarei nossa vivência pra sempre.

A seu Nado, pescador e líder da colônia de pescadores do bairro do Janga, Paulista/PE, pela sua gentileza e disponibilidade sempre que precisei.

A FACEPE (Fundação de Amparo a Ciência e Tecnologia do Estado de Pernambuco) e a CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior) pelo financiamento deste projeto.

ABSTRACT

Subprodutos da indústria pesqueira são ricos em compostos biológicos, como as proteases, e a recuperação destas tem vantagens técnicas sobre as químicas e têm amplas aplicações industriais, principalmente, em medicamentos, cosméticos, alimentos, têxteis e alimentação animal, devido a sua propriedade de alta atividade em uma ampla faixa de pH e em diferentes temperaturas. Várias técnicas de recuperação, identificação e purificação de enzimas capazes de clivar as ligações peptídicas das moléculas de colágeno e subsequentemente degradá-las em pequenos peptídeos a partir desses resíduos, tem sido utilizadas, como a técnica de semipurificação por sistema de duas fases aquosa (SDFA) que foi aplicada nos resíduos (vísceras) negligenciados da Tainha (*Mugil liza*) para tratamento de enzimas com atividade colagenolíticas. O extrato bruto (EB) obtido a partir das vísceras intestinais da Tainha (*Mugil liza*) apresentou as seguintes atividades: proteínas totais 1,02 U/mg; atividade colagenolítica: 152,0 U/mg volumétrica; 161 U/mg de atividade colagenolítica específica; 7,35 U/mL de atividade proteolítica/proteásica; e, por fim, 14,2 mg/mL de atividade proteolítica específica. No sistema de duas fases aquosa PEG/citrato, de acordo com o planejamento fatorial 2³, utilizando as variáveis Coeficiente de partição (K), Rendimento (Y), e Fator de purificação (FP) foi possível observar que os rendimentos da extração (Y) obtidos variaram de 89 a 124,34% e de 242,11 a 435,61% para protease e proteases com atividade colagenolítica, respectivamente. Os resultados mostraram a vantagem desta técnica de semipurificação no que se refere a extração e purificação de enzimas colagenolíticas com aplicação industrial. Os peptídeos de colágeno de peixe, destacados na revisão integrativa, são importantes no mercado global de peptídeos de colágeno e tem importância no desenvolvimento de biomateriais que constituem produtos farmacêuticos, cosméticos e alimentícios com isso a revisão reúne diferentes aspectos do peptídeo de colágeno, como classificação, propriedades, métodos de preparação, e aplicações em diferentes indústrias. Engloba especificamente os peptídeos de colágenos aplicados na indústria farmacêutica, de cosméticos e de alimentos. Além disso, enfatiza os aspectos regulatórios do peptídeo de colágeno comercial destacando as informações relacionadas a determinados ingredientes. Abrangendo também patentes e produtos de peptídeos de colágeno comerciais existentes com indicações. Esta revisão traz informações sobre peptídeos de colágeno com aplicações industriais abrangendo aspectos essenciais para realização de futuras

ABSTRACT

pesquisa neste campo específico.

Palavras-chaves: subprodutos; biocompostos; proteases; collagenases; purificação.

ABSTRACT

By-products from the fishing industry are rich in biological compounds, such as proteases, and their recovery has technical advantages over chemical ones and has wide industrial applications, mainly in medicines, cosmetics, food, textiles and animal feed, due to its property of high activity over a wide pH range and at different temperatures. Several techniques for recovery, identification and purification of enzymes capable of cleaving the peptide bonds of collagen molecules and subsequently degrading them into small peptides from these residues have been used, such as the semipurification technique by aqueous two-phase system (SDFA) which was applied to neglected mullet (*Mugil liza*) waste (viscera) for the treatment of enzymes with collagenolytic activity. The crude extract (EB) obtained from the intestinal viscera of Mullet (*Mugil liza*) showed the following activities: total protein 1.02 U/mg; collagenolytic activity: 152.0 U/mg volumetric; 161 U/mg specific collagenolytic activity; 7.35 U/mL of proteolytic/proteasic activity; and, finally, 14.2 mg/mL of specific proteolytic activity. In the two-phase PEG/citrate aqueous system, according to the 2³ factorial design, using the variables Partition coefficient (K), Yield (Y), and Purification factor (FP), it was possible to observe that the extraction yields (Y) obtained ranged from 89 to 124.34% and from 242.11 to 435.61% for protease and proteases with collagenolytic activity, respectively. The results showed the advantage of this semi-purification technique regarding the extraction and purification of collagenolytic enzymes with industrial application. The fish collagen peptides, highlighted in the integrative review, are important in the global collagen peptides market and are important in the development of biomaterials that constitute pharmaceutical, cosmetic and food products. , properties, preparation methods, and applications in different industries. It specifically encompasses collagen peptides applied in the pharmaceutical, cosmetics and food industries. In addition, it emphasizes the regulatory aspects of commercial collagen peptide by highlighting information related to certain ingredients. Also covering patents and existing commercial collagen peptide products with indications. This review provides information on collagen peptides with industrial applications covering essential aspects for future research in this specific field.

Keywords: by-products; biocompounds; proteases; collagenases; purification.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	10
2 REVISÃO DE LITERATURA	12
2.1. Produção Pesqueira	12
2.2. Família <i>Mugilidae</i> no Brasil	13
2.3. Característica da espécie <i>Mugil liza Valenciennes 1836</i> e o setor Pesqueiro .	14
2.4. Subprodutos do processamento de pescado	16
2.5. Particionamento de enzimas usando sistema de duas fases aquosas.....	21
2.6. Aplicações Biotecnológicas de proteases de subprodutos de peixe	23
3 OBJETIVOS	28
3.1. Objetivo geral	28
3.2. Objetivos específicos	28
4 REFERÊNCIAS.....	29
5 CAPÍTULO I	31
6 CAPÍTULO II	49
7 CONSIDERAÇÕES FINAIS	84

SUMÁRIO

Figura 1. Espécie M. Liza	15
Figura 2. Degradação do colágeno por ação de enzimas Colagenolíticas	20
Figura 3. Etapas para obtenção/extração de colagenase a partir de vísceras de peixes.....	24

ARTIGO I

Figura 1. Tratamento biotecnológico da Tainha (Mugil liza) usando o sistema de duas fases ATPS-PEG/citrato,	40
Figura 2. Diagrama de interpretação geométrica da interação entre a massa molar de PEG (MPEG, g/mol) e a concentração de citrato (Ccit, % m/m) sob o rendimento da atividade de protease (YPPEG) extraída de Mugil lisa na fase superior (rica em PEG) do sistema de duas fases aquosas (SDFA).....	45

LISTA DE TABELAS

REVISÃO BIBLIOGRAFICA

Tabela 1. Potenciais aplicações de enzimas extraídas de subprodutos de peixe 24

ARTIGO 1

Tabela 1. Experimental design 2^3 for protease and collagenolytic protease partitions using PEG-citrate ATPS..... 38

Tabela 2. Matriz do planejamento fatorial completo (2^3) com os resultados da partição da protease e da protease colagenolítica 41

Tabela 3. Efeito calculado das variáveis-respostas da fase superior no planejamento fatorial 2^3 para a partição e extração da protease e protease colagenolítica de Mugil lisa por PEG-Citrato ATPS usando ATPS 43

ARTIGO 2

Tabela 1. Métodos de recuperação de diferentes subprodutos de peixe de diferentes espécies.....62

Tabela 2. Lista de patentes de peptídeos de colágeno de resíduos de peixe..... 72

Tabela 3. Peptídeos de colágeno de peixe comercias 85

1 INTRODUÇÃO

A mudança global no consumo de alimentos tem refletido no comportamento alimentar da população, aumentando a demanda por produtos naturais e de alto valor nutritivo, como os pescados. Nos últimos anos a produção mundial pesqueira aumentou substancialmente gerando quantidades significativas de material orgânico a partir de resíduos de peixe (FAO, 2020; COPPOLA et al., 2021).

Esses resíduos ou subprodutos de peixe, são constituídos por pele, escamas, barbatanas e vísceras, e são destinados em parte à produção de farinha de peixe, fertilizantes e óleo com baixa rentabilidade para indústria ou utilizado como matéria-prima para alimentação direta na aquicultura, ou são parcialmente descartados (AHUJA et al., 2020; GUILLEN et al., 2018).

Por esta razão, é necessário uma melhor gestão dos resíduos de peixe para superar os problemas ambientais causados pelo descarte inadequado no meio ambiente e para o aproveitamento integral da biomassa destes para fins de agregar alto valor comercial a indústria. Nesse contexto, tem-se observado uma recente e crescente atenção para o uso alternativo de subprodutos de peixe desempenhando um papel importante no crescimento econômico e no desenvolvimento sustentável.

Estudos têm analisado seus possíveis usos, pois representam uma rica fonte de compostos de valor agregado, incluindo enzimas, peptídeos bioativos e biopolímeros como proteínas, com diferentes usos em diversas indústrias. Assim, o desenvolvimento e aplicação de processos para recuperação destes compostos para aplicação comercial são importantes, tendo em vista que os utilizados atualmente são, muitas vezes, de alto custo, desde a obtenção dos subprodutos até a identificação de um determinado biocomposto, como as proteínas.

Desta forma, pesquisas têm sido desenvolvidas para obtenção de métodos que possibilitem a transformação desses resíduos em produtos passíveis de utilização, como os métodos de separação, pré-purificação, e purificação de enzimas com a premissa de estudar as propriedades, estrutura e funções das enzimas. Desses métodos o Sistema de Duas Fases Aquosas (SDFA) é pertinente por reduzir em mais de 80% o custo da operação, por ser um método simples e de fácil execução. Considerado também, como uma abordagem eficiente para pré purificação e recuperação de ampla gama de biomoléculas, em especial um grupo de proteínas classificadas como proteases (DU; CHEONG; LIU, 2018).

Compoem o grupo de proteases, enzimas como pepsinas, tripsinas, quimotripsinas, lipases e collagenases; essas ultimas despertam atenção especial

devido às suas numerosas aplicabilidades em diferentes indústrias como a de alimentos, farmacêutica, têxtil e a de cosméticos, além de serem utilizadas para gerar peptídeos biologicamente ativos (NASRI et al., 2017; MAZORRA-MANZANO; RAMÍREZ-SUAREZ; YADA, 2018). Com isso, a recuperação desses biocompostos é uma forma de atender a demanda do mercado global de enzimas, agregando valor ao mercado da pesca tornando a prática de obtenção de proteases de fontes aquáticas ecologicamente sustentável.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Produção pesqueira

As espécies de frutos do mar são ricas fontes de proteínas e outros nutrientes, incluindo peptídeos, aminoácidos essenciais, ácidos graxos poliinsaturados ômega-3 de cadeia longa, carotenóides, vitaminas, incluindo vitamina B12, e minerais como cálcio, cobre, zinco, sódio, potássio, selênio, iodo (SILVA et al., 2020b). O aumento global da produção e consumo pesqueiro é um reflexo da ampla divulgação dos benefícios destes alimentos (SILVA et al., 2020a), resultando na expansão da aquicultura, cujo mercado global foi estimado em US\$ 308 bilhões em 2021 (FAO, 2021).

Dados apresentados no The State of World Fisheries and Aquaculture (SOFIA) pela Food and Agriculture Organization of the United Nations- (FAO) apontam que a produção de pescado em 2019 alcançou um recorde histórico de 171 milhões de toneladas. Deste total, 88% foi utilizado para consumo humano direto, resultando num elevado consumo per capita de 20,3 kg. De acordo com o SOFIA (2020), a piscicultura é dominada pela Ásia, que produziu 89% do total global em termos de volume nos últimos 20 anos.

Entre os maiores produtores de pescado, a China representou 37,69% da produção mundial, dos quais 60,59% foram produzidos na aquicultura (FAO, 2021). Indonésia e Índia ocupam segundo e terceiro lugar, com 6,93% e 5,55%, respectivamente. Além de principal produtor de pescados, entre 2002 e 2015, a China também foi o maior exportador de peixe e produtos da pesca. Depois de China, os principais exportadores em 2016 foram Noruega, Vietnã e Tailândia (FAO, 2021).

Em relação aos países da América do Sul, Chile, Brasil e Equador ocupam o ranking dos principais produtores, respectivamente (PEIXE BR, 2018). Segundo o modelo de produção de pescado projetado pela FAO para o ano de 2025, espera-se aumento de produção na América Latina, particularmente no Brasil, que apresenta investimentos significativos no setor e expectativa 104% superior se comparada à produção dos últimos 20 anos (FAO, 2020).

O Brasil produziu 722.560 toneladas de peixes de cultivo em 2018, com crescimento de 4,5 % sobre as 691.700 toneladas do ano anterior (PEIXE BR, 2019). Estes números indicam que a produção da piscicultura no Brasil pode

apresentar tendência à intensificação dos cultivos, demandando quantidades cada vez maiores de técnicos, alevinos e alimentos.

Portanto a piscicultura leva a um diagnóstico favorável de que o Brasil venha a abrir novas fronteiras para o desenvolvimento e expansão na produção mundial. Com destaque para Nordeste que é a segunda maior produtora, responsável por 31% da produção nacional 11.644 toneladas de peixe (IBAMA, 2017). Dentre essas espécies, as tainhas e paratis (família Mugilidae), tem destaque comercial. Elas estão amplamente distribuídas nos oceanos Pacífico e Atlântico, habitando diversos ambientes costeiros (CARVALHO-FILHO, 1999).

2.2. Tainha – Família *Mugilidae* no Brasil

A família Mugilidae possui 27 gêneros e 77 espécies (SHE; DURAND, 2016). Membros desta família ocorrem em todo o mundo, em zonas costeiras de mares tropicais, subtropicais e temperados (BHATT; MANKODI, 2020). Muitas espécies de Mugilídeos são consideradas diádromas, podendo ocorrer em ambientes distintos (marinho, estuarino e de água doce) em diferentes fases de seu ciclo de vida. Apresentam hábito alimentar zooplancτόfago quando juvenil e iliófago quando adulto, o que lhes confere papel fundamental na transferência de matéria e energia nas cadeias tróficas dos ambientes costeiros (BHATT; MANKODI, 2020).

A família Mugilidae apresenta características merísticas e morfologia muito semelhante, o que ocasiona dificuldade na identificação das espécies. Atualmente, com novos estudos de morfometria e merística, somados a estudos moleculares e genéticos, são consideradas como válidas seis espécies de Mugilídeos no Brasil: *M. curema*, *M. liza*, *M. rubrioculus*, *M. incilis*, *M. curvidens* e *M. brevirostris* (FROESE; PAULY, 2021).

As espécies *M. incilis*, *M. rubrioculus* e *M. curvidens*, denominadas popularmente como curimãs ou tainhas, são espécies capturadas pela pesca artesanal, principalmente em estuários e lagoas costeiras em alguns estados do Norte e Nordeste, apresentando um volume de produção considerável (HASAN *et al.*, 2021). *Mugil curema* e *M. brevirostris*, denominadas paratis e comuns em todo o litoral do país, também são capturadas pela pesca artesanal em alguns locais, porém, sua importância econômica é menor, devido ao reduzido tamanho atingido por essas espécies (em torno de 30 cm de comprimento total) (BATUBARA *et al.*, 2021).

A espécie mais importante de Mugilídeo para a atividade pesqueira no Brasil é a tainha *M. liza*. Esta espécie pode atingir até um metro de comprimento e sua carne é considerada de excelente qualidade. Representa a principal espécie para consumo em comunidades pesqueiras costeiras da região Sul, sustentando uma pesca artesanal histórica e culturalmente importante no litoral Sul e Sudeste do país (CASTELLINI *et al.* 2017).

A elevada abundância na costa Sul e Sudeste brasileira e o alto valor econômico, fazem com que a espécie seja explorada também pela pesca industrial durante a migração reprodutiva. Capturas industriais dirigidas para a tainha passaram a ser mais relevantes a partir do ano de 2000 quando especificamente a frota de cerco adotou a tainha como alternativa econômica ao colapso da espécie alvo desta frota, a sardinha-verdadeira – *Sardinella brasiliensis*. Além do valor econômico do pescado, as gônadas femininas maduras contribuem com o aumento do valor agregado, as quais são produto de exportação, consideradas uma alternativa ao caviar. Atualmente a tainha está entre as nove principais espécies de peixes capturados pela pesca extrativa no Brasil.

2.3. Característica da espécie *Mugil liza valenciennes* 1836 e setor pesqueiro

M. liza é uma espécie de corpo robusto, fusiforme, sem linha lateral e olhos cobertos quase que totalmente por uma membrana adiposa. Apresenta região dorsal do corpo escuro e região abdominal branca, com laterais prateadas contendo número variado de listras escuras longitudinais (FIGURA 1).

Todas as nadadeiras (com exceção das nadadeiras pélvicas) apresentam coloração, com cromatóforos escuros. A primeira nadadeira dorsal tem quatro espinhos e a segunda tem nove raios (um não ramificado e oito ramificados). A nadadeira peitoral tem um raio não ramificado e de 14 a 17 ramificados. A nadadeira pélvica tem um espinho e cinco raios ramificados e a nadadeira anal possui três espinhos e oito raios ramificados nos espécimes adultos e dois espinhos e nove raios ramificados em indivíduos menores que 30 mm de comprimento padrão. As nadadeiras dorsal e anal podem ser ou não cobertas na porção basal por pequenas escamas. Presença de 29 a 39 escamas na série transversal e de 17 a 20 escamas no pedúnculo caudal. Possui 24 ou 25 vértebras. O primeiro arco branquial tem de 22 a 80 rastros (número aumenta com aumento do comprimento padrão) (MENEZES *et al.*, 2010).



Figura 1 Espécie *M. Liza* Fonte: PEIXE BR, 2020.

Segundo o diagnóstico publicado pelo Ministério do Meio Ambiente (MMA) e Ministério da Pesca e Aquicultura (MPA) em 2018, a produção nacional de *M. liza* apresentou uma média anual de 11.092 toneladas (t). As regiões Norte e Nordeste do país foram responsáveis por 56 a 60% dos desembarques de Mugilídeos entre o período de 2018 a 2020, entretanto os dados são relativos à família Mugilidae, enquanto que o Sul e Sudeste contribuíram de 40 a 44 % do total, somente com a captura de *M. liza*. Essa espécie está entre as nove principais espécies de peixes capturados pela pesca extrativa no Brasil (MPA, 2021).

A tainha *Mugil liza* Valenciennes, 1836, passa uma parte do seu ciclo de vida em estuários, migrando para o mar durante períodos de desova (MPA, 2015). Ela está distribuída desde Bermudas, passando pelo sul da Florida, e em todo mar do caribe até o sul da Argentina (BERLETTA; DANTAS, 2016). A pesca da tainha é realizada por meio de tarrafas, redes de emalhar e redes de cerco, sendo esta última a mais comum (PROSSER, 2016).

A pesca artesanal é uma tradição em várias regiões brasileiras, sendo sua captura em frotas comerciais secundária. Usualmente sua captura aumenta no período reprodutivo, entre os meses de abril e agosto, quando migram para mar aberto para desovar.

2.4. Recuperação de biocompostos a partir de subprodutos de peixe

As indústrias de processamento de peixe geram cerca de 50 a 80% de subprodutos de pescados durante inúmeros estágios do processamento. Processos como filetagem, conservas, congelamento e produção de alimentos à base de peixe, têm aumentado a quantidade de subprodutos que muitas vezes são descartados ou usados como ingredientes de baixo valor na alimentação animal (SILA; BOUGATEF, 2016).

Quando descartados, esses subprodutos são depositados em aterros, queimados ou despejados em corpos d'água causando sérios danos ambientais

problemas (OZOGUL *et al.*, 2021), devido a grandes quantidades de nitratos e fosfatos presentes em sua composição que destrói a vida aquática reduzindo os níveis de oxigênio dissolvido (VÁZQUEZ *et al.*, 2019). Desta forma, a disposição destes produtos tem grande impacto no meio ambiente, afetando o ecossistema terrestre e aquático (SILA; BOUGATEF, 2016).

Subprodutos do pescado são as matérias-primas que não são utilizadas no processamento de pescado a nível industrial, seja da pesca ou aquicultura. Apenas 40 a 60% do pescado é utilizado no produto primário, sendo o restante desperdiçado ou subutilizado (VÁZQUEZ *et al.*, 2019). Essa quantidade de subprodutos de pescado é afetada pela espécie, tamanho do peixe, estação do ano e zona de pesca (VILLAMIL; VÁQUIRO; SOLANILLA, 2017). São considerados subproduto nadadeira, brânquias, espinha dorsal, abas da barriga, cabeça, fígado, pele, ovas, vísceras e outro. As vísceras são a maior quantidade de subprodutos do processamento de pescado que ocupa 12-18% do peso do pescado inteiro. Os demais subprodutos como cabeças, pele, ossos e escamas correspondem a 9–12%, 1–3%, 9–15% e 5%, respectivamente, ao peso corporal do peixe inteiro (MARTI-QUIJAL *et al.*, 2020; VÁZQUEZ *et al.*, 2019).

A utilização desses subprodutos do processamento de peixes é uma importante oportunidade para sustentar o meio ambiente. De acordo com o cenário atual, a estratégia de utilização destes inclui a recuperação de produtos que são potenciais fontes de macromoléculas com importantes propriedades funcionais. Esses compostos valiosos podem ser extraídos e purificados, a fim de agregar valor a mercados específicos, como por exemplo, ingredientes para indústrias alimentícias.

Recentemente vários estudos exploraram os valores agregados de subprodutos de pescado para a agricultura, na produção de fertilizante/silagem, composto, pesticida; biocombustível; ração animal, como farinha, óleo, proteína, silagem, minerais; nutrição ou suplementos, como óleos, proteínas, minerais e aminoácidos; alimentação humana, na produção de gelatina, caldo de peixe, molho de peixe, óleo de fígado; e produtos farmacêuticos, como ácidos ômega-3, cálcio, condroitina, colágeno, peptídeos bioativo (FRIEDMAN *et al.*, 2022; AL-ABADI; AL-TEMIMI, 2021; BADOEI-DALFARD; MONEMI; HASSANSHAHIAN, 2022; ZHANG *et al.*, 2022)

(Tabela

1).

Dentre os compostos biológicos com possível aplicação industrial destacam-se as enzimas digestivas recuperadas de várias espécies de peixes, incluindo espécies de águas profundas, demersais, pelágicos e de água doce. Vísceras de peixe, tais como intestino, baço, fígado e pâncreas, tem sido utilizada para obter compostos utilizando técnicas em escala laboratorial. As enzimas digestivas presentes no intestino, no pâncreas e no fígado podem ser extraídas, purificadas e recuperadas para aplicação em indústrias alimentícias (MARTI-QUIJAL *et al.*, 2020).

As proteases são as enzimas mais comuns presentes nestes órgãos, são enzimas polifuncionais capazes de catalisar e hidrolisar proteínas complexas. No entanto, as enzimas atualmente disponível e comercializada são de origem microbiana, com altos custos de produção e patogenicidade em algumas cepas, sendo esses fatores impulsionadores para estudos com fontes alternativas, não microbianas, visando uso biotecnológico, trazendo uma nova visão para a indústria pesqueira mundial (SILVA *et al.*, 2020).

Enzimas proteolíticas, proteases ou proteinases pertencem ao grupo das hidrolases as quais têm em comum o envolvimento da água na formação do produto. As proteases catalisam a reação de hidrólise das ligações peptídicas das proteínas, ocorrendo a transferência de componentes do substrato para a água. Ou seja, as enzimas proteolíticas catalisam a quebra das ligações peptídicas em proteínas. Estas enzimas constituem uma grande família (EC 3.4), dividida em endopeptidases ou proteinases (EC 3.4. 21-99) e exopeptidases (EC 3.4.11-19), de acordo com a posição da ligação peptídica a ser clivada na cadeia (PAL; SURESH, 2016).

A lista completa de enzimas isoladas e caracterizadas de peixes foram revistas sendo elas predominantemente pepsina, gastrina, tripsina, quimotripsina, collagenase, elastase, carboxipeptidase e carboxilesterase e a sua atividade catalítica pode variar dependendo do órgão e da espécie de peixe na qual foi recuperada (COPOLLA *et al.*, 2021). As collagenases (EC 3.4.24.x) são destacadas pela sua capacidade de clivar a tripla hélice do colágeno, uma proteína fibrosa que compõe a matriz extracelular, liberando fragmentos peptídicos de colágeno (FIGURA 2).

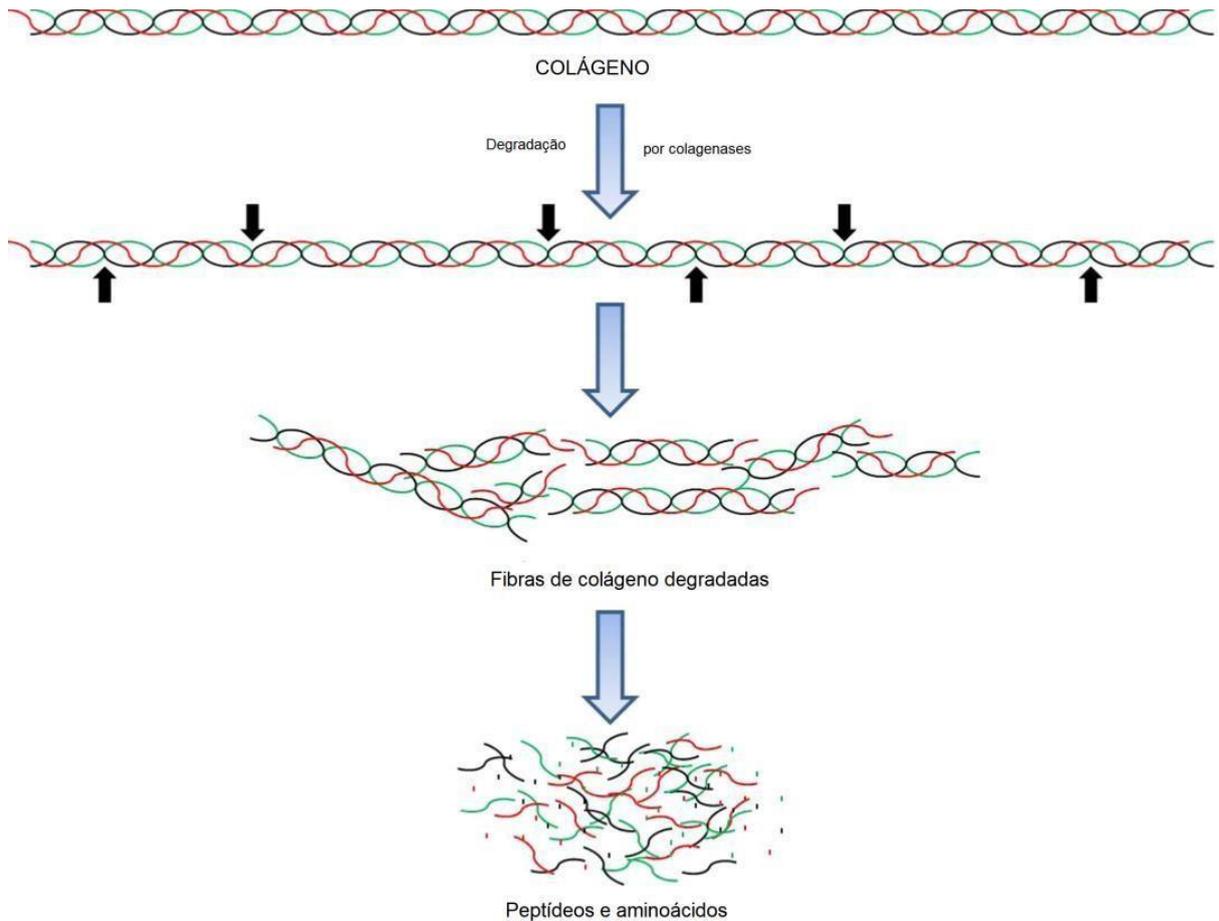


Figura 2 Degradação do colágeno por ação de enzimas colagenolíticas.
 Fonte: Bhagwata; Dandge, 2018, com adaptações.

As collagenases são divididas em dois grupos: a) collagenases verdadeiras, aquelas metalo-proteínases que necessitam de zinco (Zn^{+2}) como cofator enzimático; e b) collagenases falsas, as serino-proteínases que tem os íons divalentes, como o cálcio (Ca^{+2}) como cofator, também designadas de proteases ou enzimas com propriedades colagenolíticas. Ambas com características favoráveis para aplicação na indústria de alimentos, de ração, biofarmacêuticas, nutracêuticas e cosméticos.

As enzimas que fazem parte do grupo de serino-proteases, as que apresentam propriedades colagenolíticas, têm atraído cada vez mais a atenção do mercado de enzimas devido as suas características físico químicas, como resistência a altas temperaturas e a variações do pH do meio. Para a maioria das espécies aquáticas, o pH fisiológico situa-se numa faixa entre 6,0 e 8,0 tendo sido amplamente reportadas para espécies aquáticas de peixes teleósteos, crustáceos e esponjas, variando entre 5,0 a 10,0, a escala de recuperação de atividade (COPOLLA et al., 2021).

A temperatura é um fator limitador para proteases menos sensíveis e funciona

como ativador de proteases que convertem procolagenases. As colagenases isoladas a partir de subprodutos de peixes marinhos têm evidenciado atividade em uma faixa de temperaturas, dependendo do tecido e das espécies das quais elas foram isoladas, embora a faixa relatada até então esteja entre temperaturas 20°C e 60°C. Conhecer as características físico químicas das enzimas facilita seu emprego biotecnológico, assim como também, colabora com a determinação dos métodos de pré-purificação e purificação de enzimas que não danifiquem esses compostos em nível de escala nível industrial.

Colagenases foram isoladas de vísceras de várias espécies de peixes tanto em habitats frios, como robalo-branco (*Centropomus undecimalis*) (SILVA *et al.*, 2021), peixe serra (*Scomberomorus sierra*) (FIMBRES-ROMERO *et al.*, 2021), truta arco-íris (*Oncorhynchus Mykiss*) (ANDEVARI *et al.*, 2019), e peixes de água quente tucunaré (*Cichla ocellaris*) (OLIVEIRA *et al.*, 2021), peixe panga (*Pangasius sutchi*) (SAHIMI; NORMAH, 2021). A recuperação de enzimas proteolíticas de subprodutos da pesca podem, portanto, contribuir para a produção de novas proteases de baixo custo para aplicação industrial e simultaneamente para resolver os problemas de gestão das devoluções da pesca. A extração e purificação de enzimas proteolíticas de vísceras de peixes são geralmente realizadas por várias técnicas de separação, como precipitação salina e orgânica, cromatografia, ou separação de fases por um sistema aquoso de duas fases.

2.5. Particionamento de enzimas usando sistema de duas fases aquosas

O sistema de duas fases aquosas (SDFA) é um método caracterizado como um sistema de fracionamento envolvendo uma composição líquido-líquido e, reconhecido como um método muito simples e de fácil execução, de abordagem eficiente para purificação e recuperação de ampla gama de biomoléculas, em especial as enzimas. O SDFA tem a vantagem de ser um método econômico e bastante promissor, já que se podem estudar em uma única

etapa, características como a concentração e purificação parcial da molécula em questão (KARAKUS *et al.*, 2018).

Geralmente, os SDFA são compostos de solução aquosa de dois polímeros incompatíveis e polímero/sais. Quando a concentração destes componentes aumento acima de um determinado valor crítico ocorre a formação de duas fases (KARAKUS *et al.*, 2018). O primeiro sistema PEG/sal a ser utilizado pela indústria foi o sistema composto por PEG/fosfato. Além de fosfato, outros sais como sulfatos e citratos, podem ser empregados em sistema de duas fases aquosas (YUZUGULLU; DUMAN, 2015).

O SDFA é formado pela mistura de dois polímeros hidrófilos ou um polímero e um sal, em determinadas concentrações (KARAKUS *et al.*, 2018). Após a homogeneização, cada componente do sistema é concentrado em uma das fases, favorecendo, deste modo, a partição de biomoléculas, tais como proteínas, células, fragmentos celulares ou ácidos nucleicos. A estratégia básica de separação em SDFA baseia-se na predominante partição da molécula de interesse para uma das fases do sistema e as contaminantes para a fase oposta (KARAKUS *et al.*, 2018).

Neste sistema, as proteínas são divididas entre as duas fases com um coeficiente de partição que pode ser modificado se as condições experimentais do meio como pH, sais, força iônica e outros, forem alterados. O polietileno glicol (PEG) é um polímero vastamente utilizado em SDFA por ser uma molécula inerte e de carga neutra que dificilmente desnatura proteínas (YUZUGULLU; DUMAN, 2015).

O sal citrato de sódio também é um composto desejável para formar o sistema de duas fases, pois ele é atóxico para humanos e biodegradável quando presente em rios, lagos e solo. No SDFA, geralmente quase todas as biomoléculas menores tendem migrar para a fase inferior (fase sal) que é mais polar. Considerando que as proteínas permanecem na fase superior (fase PEG) menos polar, esta não é a ideal para a recuperação de proteínas. A fase polimérica requer etapas adicionais como ultrafiltração e cromatografia que aumentaria o custo do processo.

Os mecanismos que regem a partição de biomoléculas em um determinado SDFA ainda não são totalmente compreendidos. Em geral, o particionamento de proteína é impulsionado por Van der Waals, ligação de hidrogênio, hidrofóbicas e iônicas, interações entre as biomoléculas e a fase circundante. Portanto, várias

condições podem influenciar a partição das macromoléculas, tais como: tamanho, carga, hidrofobicidade da molécula; concentração e massa molar do polímero; tipo e concentração do sal utilizado; e, por fim, o pH.

Embora existam vários métodos disponíveis para a purificação de biomoléculas, estes são por vezes considerados onerosos e de etapas complexas que resultam em perdas na recuperação dos produtos biológicos. Por consequência, o interesse em técnicas mais economicamente viáveis, como SDFA, e com menor número de etapas tem se tornado cada vez mais atraente no tratamento de biomoléculas com aplicação industrial, como as enzimas.

Em estudo com espécie de tucunaré (*C. ocellaris*), Oliveira *et al.* (2020) obtiveram purificação parcial maior do que 100%, das proteases colagenolíticas de resíduos descartados pela indústria pesqueira; semipurificação similar foi relatada por Silva *et al.* (2020) ao recuperarem enzimas colagenolíticas de robalo-flexa (*Centropomus undecimalis*), concluindo que essas técnicas de semipurificação no que diz respeito ao baixo custo de extração e purificação, é um sistema eficaz para aplicação em matérias-primas pesqueira para aproveitamento dos resíduos de seu processamento para a indústria.

2.6. Aplicações biotecnológicas de proteases de subprodutos de peixe

Atualmente a indústria utiliza métodos enzimáticos para o desenvolvimento de processos para elaboração de produtos para consumo humano, aproximadamente 60% do mercado total de enzimas envolve o uso de proteases (SAWANT; NAGENDRAN, 2014). As vantagens do uso de enzimas recuperadas de subprodutos de peixe já foram descritas, sendo elas os baixos custos e a garantia de melhor controle dos processos utilizados (OLIVEIRA *et al.*, 2017; OLIVEIRA *et al.*, 2019). O processo de extração/obtenção e as aplicações industriais de colagenases ou de proteases com propriedades colagenolíticas estão descritas na figura 3.

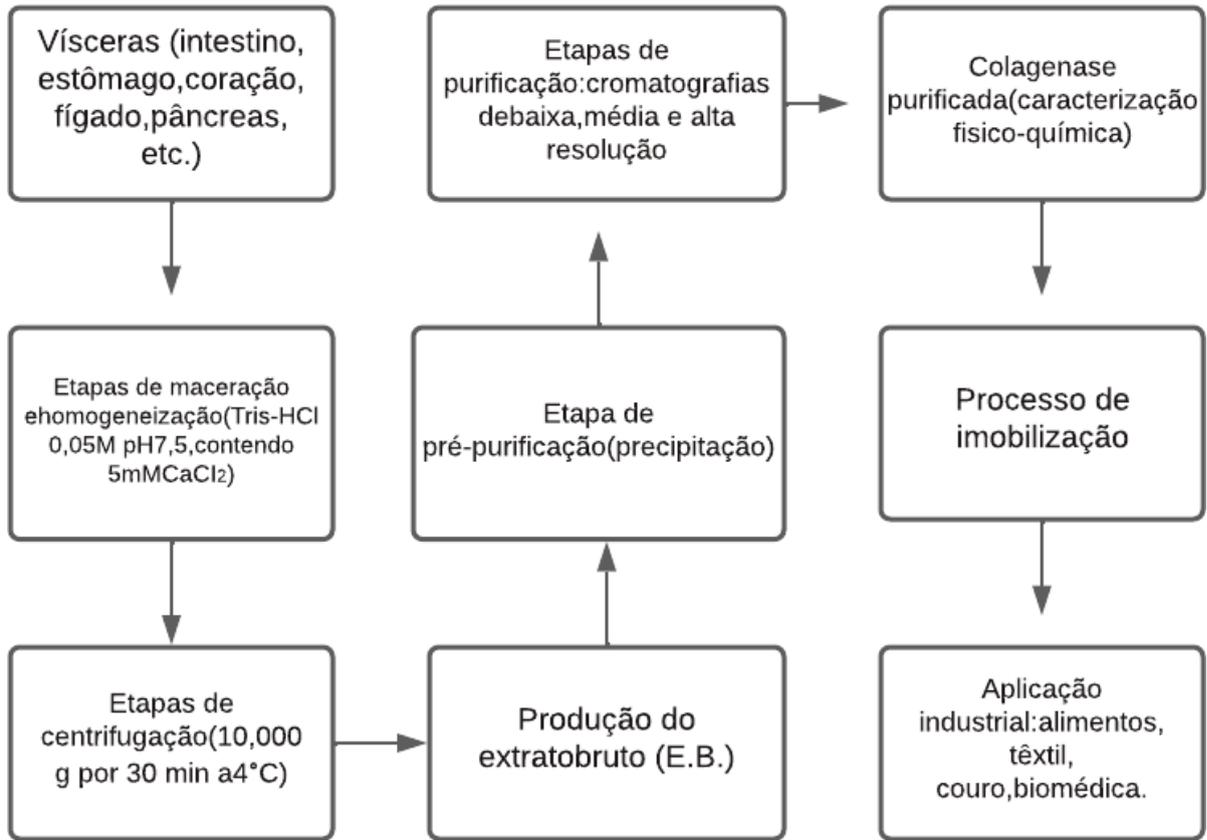


Figura 3 Etapas para obtenção/extração de colagenase a partir de vísceras de peixes.
 Fonte: OLIVEIRA et al. (2017). Criada no software lucidchart.com

As proteases podem ser aplicadas em alimentos, produtos farmacêuticos e processos de produção de cosméticos devido ao grande potencial catalítico. Além disso, algumas enzimas têm propriedades curativas ou podem ser usadas como agentes terapêuticos em patologias nas quais a atividade da enzima endógena é reduzida. Na Tabela 2 estão demonstradas as potenciais aplicações de enzimas derivadas de subprodutos de peixes.

Tabela 1. Potenciais aplicações de enzimas extraídas de subprodutos de peixe

ENZIMAS	INDUSTRIA	APLICAÇÃO	REFERÊNCIA
PEPSINA	Farmacêutica Cosméticos	Extração de colágeno, agentes terapêuticos, hidrolisado de peixe, e produção de peptídeos bioativos.	ESTIASIH <i>et al.</i> (2021) FRIEDMAN <i>et al.</i> (2022)
	Laticínios	Produção de queijos.	
	Pesqueira	Silagem de peixe, produção de caviar, desincrustação de peixe.	
	Beneficiamento do Couro	Remoção de pele e resíduos teciduais.	MATHEW <i>et al.</i> (2022)
	Alimentícia	Produção de flavonoides de frutos do mar, extração de caroteno, proteína, molho de peixe.	
TRIPSINA	Laticínios	Produção de queijo.	
	Farmacêutica	Agentes terapêuticos, cicatrização de feridas, medicina veterinária.	MATHEW <i>et al.</i> (2022); GANZÁLES-FÉLIZ <i>et al.</i> (2021)
QUIMIOTRIPSINA	Processamento de alimentos	Amaciar a carne, melhorar o valor nutricional dos alimentos, produção de hidrolisado de proteína.	OZOGUL <i>et al.</i> (2021)

	Pesqueira	Remoção de proteínas ósseas	
	Laticínios	Produção de queijos	
	Beneficiamento de couro	Remoção de pelo e tecidos	
	Detergente	Agente descontaminante, agente de limpeza	
COLAGENASE	Pesqueira	Descascamento e amaciamento de lulas, processamento de surimi, maturação de peixe, produção de hidrolisados de proteínas	NAYAK <i>et al.</i> (2020)
	Processamento de alimentos	Estabilizante e clarificante	
	Detergente	Agente de limpeza	
LIPASE	Alimentos	Intensificador de sabores	NAYAK <i>et al.</i> (2020)
QUITINASE	Farmacêutica e Nutracêutica	Produção de quitina e oligômeros de quitosana, Produção de glucosamina.	NAYAK <i>et al.</i> (2020)

O benefício da utilização industrial dessas enzimas está em sua efetividade durante os processos, menor custo e características físico químicas como: atividade em baixa temperatura e alta pressão, dão a essas potencialidades para seres usadas como uma alternativa competitiva para enzimas tradicionais.

3 OBJETIVOS

3.1. Objetivo Geral

Particionar proteases obtidas dos resíduos de tainha (*Mugil liza*) utilizando sistema de duas fases aquosas, visando sua aplicação na produção de peptídeos de colágeno.

3.2 Objetivos específicos

Realizar uma seleção de resíduos de tainha (*M. liza*) com potencial para fornecer proteases de interesse biotecnológico;

Extrair proteases de vísceras digestivas de tainha (*M. liza*) visando sua obtenção para fins industriais;

Particionar as proteases obtidas das vísceras digestivas de tainha (*M. liza*) utilizando sistema de duas fases aquosas (PEG/Citrato);

Realizar uma revisão integrativa a respeito do potencial biotecnológico dos resíduos do processamento de peixes Neotropicais com potencial para fornecimento de biomoléculas proteicas.

REFERÊNCIAS

- ASSAD, S.; BOUGATEF, A. Antioxidant peptides from marine by-products: Isolation, identification and application in food systems. A review. **Journal of Functional Foods**, v.21, p.10-26, 2016.
- BHAGWAT, P.K.; DANDGE, P.B. Collagen and collagenolytic proteases: A review. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v.15, p.43–55, 2018.
- CARVALHO-FILHO, A. **Peixes: costa brasileira**. 3. ed. Melro, São Paulo. 1999.
- COPPOLA, D.; LAURITANO, C.; PALMA ESPOSITO, F.; RICCIO, G.; RIZZO, C.; de PASCALE, D. Fish Waste: From Problem to Valuable Resource. **Marine Drugs**, v.19, n.116, 2021.
- DABOOR, S.M.; BUDGE, S.M.; GHALY, A.E.; BROOKS, M.S.; DAVE, D. Isolation and activation of collagenase from fish processing waste. **Advances in Bioscience and Biotechnology**, v.,3, p.191–203, 2012.
- DESAI, A.S.; BRENANN, M.; GANGAN, S.S.; BRENNAN, C. Chapter seven - Utilization of Fish Waste as a Value-Added Ingredient: Sources and Bioactive Properties of Fish Protein Hydrolysate. **Sustainable Fish Production and Processing**, p.203-225, 2022.
- DU, L.- P.; CHEONG, K.-L.; LIU, Y. Optimization of an aqueous two-phase extraction method for the selective separation of sulfated polysaccharides from a crude natural mixture. **Separation and Purification Technology**, v.202, n.31, p.290-298, 2018.
- ESTIASIH, T.; AHMADI, K.; ALI, D.Y.; NISA, F.C.; SUCENO, S.H.; LESTARI, L.A. Valorisation of viscera from fish processing for food industry utilizations. **IOP Conference Series: Earth and Environmental Science**, v.924, 2021.
- FAO (2021). **Organização das Nações Unidas para Alimentação e Agricultura**. <https://www.fao.org/brasil/pt/>. Acessado em 12 de janeiro de 2022.
- FRIEDMAN, I.S.; BEHRENS, L.A.; PEREIRA, N.A.; CONTRETAS, E.M.; FERNÁNDEZ-GIMENEZ, A.V. Digestive proteinases from the marine fish processing wastes of the South-West Atlantic Ocean: Their partial characterization and comparison. **Fish biology**, v.100, n.1, 2021.
- FIMBRES-ROMERO, M.J.; CABRERA-CHÁVEZ, F.; EZGUERRA-BRAUER, J.M. Utilisation of collagenolytic enzymes from sierra fish (*Scomberomorus sierra*) and jumbo squid (*Dosidicus gigas*) viscera to generate bioactive collagen hydrolysates from jumbo squid muscle. **Journal Food Science Technology**, v.58, p.2725–2733, 2021.
- FROESE, R; PAULY, D. 2010. Fishbase. **World Wide Web electronic publication**. www.fishbase.org. Acesso em 12 fevereiro 2022.

GONZÁLEZ-FÉLIX, M.L.; REÉ-RODRÍGUEZ, C.D.L.; PEREZ-VELAZQUEZ, M. Optimum Activity and Partial Characterization of Chymotrypsin from the Sciaenids *Cynoscion othonopterus*, *Cynoscion parvipinnis*, and *Cynoscion xanthulus*. **Journal of Aquatic Food Product Technology**, v.30, 2021.

IBAMA – Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis. **Estatística da Pesca 2017 Brasil: grandes regiões e unidades da federação**. Brasília: Ibama, 2017.

JAZIRI, A.A.; SHAPAWI, R.; MOKHTAR, R.A.M.; NOORDIN, W.N.M.; HUDA, N. By-products of Surimi from Tropical Marine Fish: Use and Potential Application in Functional Food. **Food Reviews International**, p. 1-26, 2021.

KARAKUS, Y.Y.; ACEMI, A.; ISIK, S.; DUMAN, Y. Purification of peroxidase from *Amsonia orientalis* by three-phase partitioning and its biochemical characterization. **Separation Science and Technology**, v.53:5, p.756-766, 2018.

LEBRETON, B.; RICHARD, P.; PARLIER, E.P.; GUILLOU, G.; BLANCHARD, G.F. Trophic ecology of mullets during their spring migration in a European saltmarsh: A stable isotope study. **Estuarine, Coastal and Shelf Science**, v.91, n.4, p.502-510, 2011.

MARTI-QUIJAL, F.J.; REMIZE, F.; MECA, G.; FERRER, E.; RUIZ, M.-J.; BARBA, F.J. Fermentation in fish and by-products processing: An overview of current research and future prospects. **Current Opinion in Food Science**, v.31, p.9–16, 2020.

MATHEW, G.M.; HUANG, C.C.; SINDHU, R.; BINOD, P.; PANDEY, A. **Chapter 15 - Enzymes in seafood processing**. Ed. KUDDUS, M.; AGUILAR, C.N. In *Food Products and Processing Through Enzyme Technology*, Academic Press, 2022, Pages 189-204.

MENEZES, N.A.; NIRCHIO, M.; OLIVEIRA, C.; SICCHARAMIREZ, S. Taxonomic review of the species of *Mugil* (Teleostei: Perciformes: Mugilidae) from the Atlantic South Caribbean and South America, with integration of morphological, cytogenetic and molecular data. **Zootaxa**, v.3918, n.1, p.1-38, 2015.

MENEZES, N.A. Guia prático para o reconhecimento e identificação de tainhas e paratis Pisces-Mugilidae do litoral brasileiro. **Revista Brasileira de Zoologia**, v.21, p.1-12, 1983.

MENEZES, N.A.; OLIVEIRA, C.; NIRCHIO, M. An old taxonomic dilemma: the identity of the western south Atlantic lebranche mullet Teleostei: Perciformes: Mugilidae. **Zootaxa**, v.2519, p.59-68, 2010.

MPA – Ministério da Pesca e Aquicultura. **Boletim estatístico da pesca e aquicultura 2019**. Brasil, 2020.

MPA/MMA. **Plano de gestão para o uso sustentável da tainha, *Mugil liza* Valenciennes, 1836, no Sudeste e Sul do Brasil**. Brasília: 2015, 137p.

NAGARAJA V. H; IYYASWAMI R. Aqueous two phase partitioning of fish proteins: partitioning studies and ATPS evaluation. **Journal Food Science Technology**, v.52, n.6, p.3539–3548, 2014.

NASRI, M. Chapter Four - Protein Hydrolysates and Biopeptides: Production, Biological Activities, and Applications in Foods and Health Benefits. A Review. **Advances in Food and Nutrition Research**, v.81, p.,109-159, 2017.

NELSON, J.S. Fishes of the World, 4th edn. New York, NY: John Wiley & Sons, Inc. Fonseca Neto, JC, & HL Spach. 1999. Sobrevivência de juvenis de *Mugil platanus* Günther, 1880 (Pisces, Mugilidae) em diferentes salinidades. **Boletim do Instituto de Pesca**, v.25, p.13-17, 2006.

NAYAK, A.; MUJUMDAR, R.K.; NARESH, K.M.; MOHANTY, U.; SOMANTARAY, S. Effect of feeding habits of fish on the characteristics of collagenolytic proteases isolated from the visceral waste. **Journal of Food Science and Technology**, v.58, p.1585–1592, 2021.

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

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

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

OLIVEIRA, V.M.; CUNHA, M.N.C.; ASSIS, C.R.D.; BATISTA, J.M.S.; NASCIMENTO, T.P.; SANTOS, J.F.; LIMA, C.A.; MARQUES, D.A.V.; BEZERRA, R.S.; PORTO, A.L.F. Separation and partial purification of collagenolytic protease from peacock bass (*Cichla ocellaris*) using different protocol: precipitation and partitioning approaches. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v.24, 2020a.

OLIVEIRA, V.M. et al. (2020b). **Novas Abordagens para isolamento de proteínas extraídas de resíduos da indústria pesqueira**. In: SANTANA, R.F.; ARAGÃO JÚNIOR, W.R.; EL-DEIR, S.G. (Orgs.). Resíduos sólidos: desenvolvimento e sustentabilidade. 1ª ed. Recife: EDUFRPE, 264-273.

OLIVEIRA, V.M.; ASSIS, C.R.D.; COSTA, B.A.M.; NERI, R.C.A.; MONTE, F.T.D.; FREITAS, H.M.S.C.V.; FRANÇA, R.C.P.; SANTOS, J.F.; BEZERRA, R.S.; PORTO, A.L.F. Physical, biochemical, densitometric and spectroscopic techniques for characterization collagen from alternative sources: A review based on the sustainable valorization of aquatic by-products. **Journal of Molecular Structure**, v.1224, 2021.

OLIVEIRA, V.M. **Obtenção de proteases a partir do trato digestivo de peixes neotropicais para aplicação na produção de peptídeos de colágeno**. 2015. 243 f. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas), Universidade Federal de Pernambuco, Recife. Disponível em: <https://repositorio.ufpe.br/handle/123456789/14976>. Acesso em 12 de janeiro de 2022.

OZOGUL, F.; CAGALJ, M.; ŠIMAT, V.; OZOGUL, Y.; TKACZEWSKA, J.; HASSOUN, A.; KADDOUR, A.A.; KULEY, E.; RATHOD, N.B.; PHADKE, G.G. Recent developments in valorisation of bioactive ingredients in discard/seafood processing by-products. **Trends Food Science Technology**, v.116, p.559–582, 2021.

PATEIRO, M.; MUNEKATA, P.E.S.; DOMÍNGUEZ, R.; WANG, M.; BARBA, F.J.; BERMÚDEZ, R.; LORENZO, J.M.M. Nutritional Profiling and the Value of Processing By-Products from Gilthead Sea Bream (*Sparus aurata*). **Marine Drugs**, v.18, 2020.

PEIXE BR (2018). **Associação Brasileira de Piscicultura**. <https://www.peixebr.com.br/anuario2018/>. Acessado em 22 de dezembro 2021.

SAWANT, R.; NAGENDRAN, S. Protease: An enzyme with multiple industrial applications. **World Journal Pharmacy and Pharmaceutical Science**, v.3, p.568–579, 2014.

SECKENDORFF, R.W.; AZEVEDO, V.G. Abordagem histórica da pesca da tainha *Mugil platanus* e do parati *Mugil curema* Perciformes: Mugilidae no litoral norte de São Paulo. **Série Relatorios Técnicos**, v.28, p.1–10, 2007.

SILVA, J.C.; LINO, L.H.S.; CUNHA, M.N.C.; BATISTA, J.M.S.; OLIVEIRA, V.M.; PORTO, A.L.F. Extraction of collagenolytic enzyme from fish viscera by phase partitioning (PEG/citrate) and its potential for industrial application. **Boletim do Instituto de pesca**, v.46, p.1-8, 2020.

SOFIA (2020). **State of The World Fisheries and Aquaculture**. <https://www.seafoodbrasil.com.br/especial-sofia-2020-aquicultura-cresce-53-por-ano-desde-2000>. Acessado em 05 de janeiro de 2022.

SHAHIDI, F.; VARATHARAJAN, V.; PENG, H.; SENADHEERA, R. Utilization of marine by-products for the recovery of value-added products. **Journal Food Bioactives**, v.6, p.10–61, 2019.

THOMSON, J.M. The Mugilidae of the world. **Memoirs of the Queensland Museum**, v.41, p.457–562, 1997.

VÁZQUEZ, J.; MEDUÍÑA, A.; DURÁN, A.; NOGUEIRA, M.; FERNÁNDEZ-COMPÁS, A.; PÉREZ-MARTÍN, R.; RODRÍGUEZ-AMADO, I. Production of Valuable Compounds and Bioactive Metabolites from By-Products of Fish Discards Using Chemical Processing, Enzymatic Hydrolysis, and Bacterial Fermentation. **Marine Drugs**, v.17, n.139, 2019.

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

YUZUGULLU, Y.; DUMAN, Y. A. Aqueous Two Phase (PEG4000/Na₂SO₄) Extraction and Characterization of an Acid Invertase from Potato Tuber (*Solanum Tuberosum*). **Preparative Biochemistry and Biotechnology**, v.7, p. 696-711, 2015.

5 CAPÍTULO 1

ARTIGO I: POTENCIAL BIOTECNOLÓGICO DO RESÍDUO DE *Mugil lisa*:
EXTRAÇÃO DE PROTEASES E PROTEASES COLAGENOLITICAS POR
SISTEMAS DE FASES

Esse artigo está adaptado ao periódico: Boletim de Pesca

Fator de Impacto: 1.058



POTENCIAL BIOTECNOLÓGICO DO RESÍDUO DE *Mugil liza*: EXTRAÇÃO DE PROTEASES E PROTEASES COLAGENOLITICAS POR SISTEMAS DE FASES

Quésia Jemima da Silva^a, Vagne de Melo Oliveira^a, Márcia Nieves Carneiro da Cunha^a, Juanize Matias da Silva Batista^a, Ana Lúcia Figueiredo Porto^{a*}

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

* Autor de Correspondência:

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

Tel: + 55 (81) 3320.634

RESUMO

As enzimas extraídas de vísceras têm vantagens técnicas sobre as químicas e têm amplas aplicações industriais, principalmente, em medicamentos, cosméticos, alimentos, têxteis e alimentação animal, devido a sua propriedade de alta atividade em uma ampla faixa de pH e em diferentes temperaturas. Várias técnicas de recuperação, identificação e purificação de enzimas capazes clivar as ligações peptídicas das moléculas de colágeno e subsequentemente degrada-las em pequenos peptídeos a partir desses resíduos, tem sido utilizadas, como a técnica de semipurificação por sistema de duas fases aquosa (SDFA) que foi aplicada nos resíduo (vísceras) negligenciados da Tainha (*Mugil liza*) para tratamento de enzimas com atividade colagenolíticas. O extrato bruto (EB) obtido a partir das vísceras intestinais da Tainha (*Mugil liza*) apresentou as seguintes atividades: proteínas totais 1,02 U/mg; atividade colagenolítica: 152,0 U/mg volumétrica; 161 U/mg de atividade colagenolítica específica; 7,35 U/mL de atividade proteolítica/proteásica; e, por fim, 14,2 mg/mL de atividade proteolítica específica. No sistema de duas fases aquosa PEG/citrato, de acordo com o planejamento fatorial 2³, utilizando as variáveis Coeficiente de partição (K), Rendimento (Y), e Fator de purificação (FP) foi possível observar que os rendimentos da extração (Y) obtidos variaram de 89 a 124,34% e de 242,11 a 435,61% para protease e proteases com atividade colagenolítica, respectivamente. Os resultados mostraram a vantagem desta técnica de semipurificação no que se refere a extração e

purificação de enzimas colagenolíticas com aplicação industrial.

Palavras-chaves: resíduos; purificação; proteases; colagenases.

ABSTRACT

Enzymes extracted from viscera have technical advantages over chemical ones and have wide industrial applications, mainly in medicines, cosmetics, food, textiles and animal feed, due to their high activity property in a wide pH range and at different temperatures. Several techniques for recovery, identification and purification of enzymes capable of cleaving the peptide bonds of collagen molecules and subsequently degrading them into small peptides from these residues have been used, such as the semipurification technique by aqueous two-phase system (SDFA) which was applied to neglected mullet (*Mugil liza*) waste (viscera) for the treatment of enzymes with collagenolytic activity. The crude extract (EB) obtained from the intestinal viscera of Mullet (*Mugil liza*) showed the following activities: total protein 1.02 U/mg; collagenolytic activity: 152.0 U/mg volumetric; 161 U/mg specific collagenolytic activity; 7.35 U/mL of proteolytic/proteasic activity; and, finally, 14.2 mg/mL of specific proteolytic activity. In the two-phase PEG/citrate aqueous system, according to the 2³ factorial design, using the variables Partition coefficient (K), Yield (Y), and Purification factor (FP), it was possible to observe that the extraction yields (Y) obtained ranged from 89 to 124.34% and from 242.11 to 435.61% for protease and proteases with collagenolytic activity, respectively. The results showed the advantage of this semi-purification technique regarding the extraction and purification of collagenolytic enzymes with industrial application.

Keywords: waste; purification; proteases; collagenases.

1. INTRODUÇÃO

Cerca de 60% do mercado de enzimas utiliza proteases em suas aplicações comerciais, como tripsina, quimotripsina e colagenase são de grande interesse comercial por apresentarem vantagens técnicas sobre suas análogas sintéticas, com amplas aplicações industriais, principalmente na indústria de medicamentos, cosméticos, alimentos, têxteis e alimentação animal, devido as suas propriedades químicas como alta atividade em uma ampla faixa de pH e em diferentes temperaturas (SHALABY *et al.*, 2016; RAVEENDRAN *et al.*, 2018).

As colagenases representam um grupo de enzimas que hidrolisam as ligações peptídicas de vários tipos de colágeno. Após a hidrólise do colágeno por colagenase,

os peptídeos de colágeno são moléculas bioativas formadas que atuam como (inibidores da ECA), ligantes de minerais, antimicrobianos, imunomoduladores, citomodulador, antitrombótico, antioxidante e hipocolesterolêmico (HARTMANN e MEISEL, 2007; ERDMANN et al., 2008). As vísceras digestivas de peixes, como intestinos e cecos são ricas fontes de enzimas que têm a propriedade de decompor o colágeno, tornando-se uma potencial fonte relevante de novos produtos para a indústria e o mercado enzimático.

Assim o sistema bifásico aquoso (ATPS) é utilizado como método não cromatográfico para extração, recuperação e purificação de collagenases, assim como outras proteases. Sua eficiência está relacionada ao estudo e análise de seus componentes a fim de obter um alto fator de purificação (PF), rendimento (Y) e atividade específica da biomolécula de interesse (NADAR et al., 2018; WANDERLEY et al., 2017). O ATPS pode ser composto por uma variedade de componentes de solução aquosa, entre os quais dois polímeros imiscíveis (geralmente polietilenoglicol-PEG e dextrano), ou uma mistura de um polímero e um sal (fosfato, sulfato ou citrato) (SILVA et al., 2018).

A partição de biomoléculas é influenciada pelo peso, tamanho e concentração do polímero, concentração e tipo do sal, temperatura, pH (Baskaran et al., 2018; Poonsin et al., 2017; Shad et al., 2018), tamanho, interações hidrofóbicas e conformação da biomolécula alvo; sendo o último parâmetro considerado o fator chave (Grilo et al., 2016). Além disso, a extração de ATPS apresenta algumas vantagens peculiares, como rapidez, alta seletividade, otimização e alta taxa de recuperação (Shad et al., 2018; Vobecká et al., 2018), baixo custo (Wu et al., 2017), simplicidade, eficácia na separação de biomoléculas de contaminantes (Phong et al., 2018) e ecologia devido à reciclagem de componentes (Iqbal et al., 2016; Soares et al., 2015). sendo o último parâmetro considerado o fator chave (Grilo et al., 2016).

Assim a extração por ATPS apresenta algumas vantagens peculiares, como rapidez, alta seletividade, otimização e alta taxa de recuperação (Shad et al., 2018; Vobecká et al., 2018), baixo custo (Wu et al., 2017), simplicidade, eficácia na separação de biomoléculas de contaminantes (Phong et al., 2018) e ecologia devido à reciclagem de componentes (IQBQL et al., 2016). Com isso a extração de ATPS apresenta algumas vantagens peculiares, como rapidez, alta seletividade, otimização e alta taxa de recuperação (SHAD et al., 2018), baixo custo (WU et al., 2017), simplicidade, eficácia na separação de biomoléculas de contaminantes (Phong et al., 2018) e ecologia devido à reciclagem de componentes (IQBAL et al., 2016; SOARES et al., 2015).

Desta forma, o presente estudo objetivou avaliar a atividade de proteases colagenolíticas de vísceras de Taíinha (*Mugil liza*) e o potencial de purificação dessas proteases aplicando o sistema aquoso bifásico, visando investigar suas potencialidades biotecnológicas para aplicação industrial.

2. METODOLOGIA

2.1 Obtenção do resíduo

As vísceras da Taíinha (*Mugil liza*) foram obtidas na comunidade pesqueira localizada no litoral norte de Pernambuco e transportadas para o Laboratório de Tecnologia de Bioativos (LABTECBIO), situado no departamento de Morfologia e Fisiologia Animal (DMFA/UFRPE) e armazenados a 4°C até posterior produção do extrato bruto.

2.2 Obtenção do extrato bruto (EB)

Os resíduos viscerais dos peixes foram pesados e cortados em pedaços pequenos, após esse processo os tecidos foram macerados. Os tecidos homogenizados foram então homogeneizados com solução tampão Tris-HCl 20mM com pH 7,8. O homogeneizado foi centrifugado a 10.000 rpm por 15 min a 4°C e o sobrenadante foi coletado.

2.3 Determinação da concentração de proteínas

As concentrações de proteína de todas as amostras foram determinadas por o método do ácido bicinconínico (BCA) de acordo com Smith et al. (1985).

2.4 Determinação da atividade proteásica

A atividade da protease foi determinada como descrito por Ginther (1979). Para essa determinação, adicionou-se 0,15 mL do extrato enzimático e 0,25 mL de azocaseína (1% (p/v) em tampão Tris HCl, 0,2 M pH 7,2 e colocou-se em câmara escura por uma hora à temperatura ambiente. A reação foi interrompida, após o tempo indicado, com 1 mL de ácido tricloroacético (TCA) a 10% (p/v) e em seguida a

solução foi centrifugada a 12.000 rpm por 20 minutos e temperatura de 4 °C. Foi feita a leitura por espectrometria com 0,8 mL do sobrenadante pipetado adicionado de 0,2 mL de NaOH 1,8 N, a absorbância foi medida a 420 nm contra um branco.

2.2 Determinação da atividade colagenolítica

As propriedades colagenolíticas foram determinadas de acordo com Oliveira et al. (2019), usando azocoll como substrato. Uma mistura de reação, que contém 5 mg de azocoll, 500µl de 50 mM Tris-HCl (pH 7,5) que continha CaCl₂ 5 mM e 500µl de extrato enzimático, foram incubados a 55°C durante 30 minutos, sob agitação constante e em triplicata. Posteriormente, foram adicionados 200µl de ácido tricloroacético (TCA) e incubadas para parar a reação. Após 10 min., as amostras foram centrifugadas (Centrífuga Sorvall Superspeed RC-6, Carolina do Norte, EUA) a 10.000 x g durante 10 min., a 4°C. A leitura da amostra foi realizada com espectrofotômetro em um comprimento de onda de 520 nm.

2.5 Extração de proteases e proteases colagenolíticas por sistemas de duas fases aquosas (SDFA)

Os sistemas de duas fases aquosas (SDFA) foram preparados a 25 ± 1 °C em tubos graduados de 15 mL a partir da mistura de uma solução concentrada (30% m/m) de citrato trissódico e ácido cítrico pH 7,0, e de soluções de PEG com diferentes massas molares para concentrações finais determinadas de acordo planejamento fatorial 2³ (Tabela 1) consistindo em 8 ensaios experimentais e 3 repetições do ponto central, a fim de estimar o erro experimental (NETO; SCARMINIO; BRUNS, 2006). O extrato enzimático (representando 20% do volume final dos sistemas) foi adicionado aos tubos e posteriormente diferentes volumes de água destilada foram adicionados aos sistemas para massa final de 10 g. As suspensões obtidas foram homogeneizadas em vórtice por 1 min, e mantidas repouso por 60min para separação das fases por decantação.

O volume de cada fase foi medido e as fases superior e inferior foram separadas e analisadas quanto à concentração de proteína e atividades enzimáticas. Para tal, interferência experimental do polímero e do sal foi medida preparando amostras em branco contendo a mesma composição de fase, com adição de 20% de água destilada. A análise estatística dos resultados foi realizada por meio do software Statistica 8.0 (Stasoft Inc. 2008), a influência das variáveis

independentes PEG massa molar (MPEG), concentração de PEG (CPEG), concentração de citrato de sódio (CCIT) e de suas interações sob as variáveis respostas coeficiente de partição (K), rendimento de extração (Y, %) e fator de purificação (FP) foram determinadas.

Tabela 1. Desenho experimental 2³ para partições de protease e protease colagenolítica usando PEG-citrato ATPS.

Variables	Levels		
	Low (-1)	Central (0)	High (+1)
^a MPEG (g/mol)	400	3350	8000
^b CPEG (% w/w)	20	22	24
^c Ccit (% w/w)	15	17.5	20

^aMPEG = PEG molar mass

^bCPEG = PEG concentration

^cCcit = Citrate concentration

2.6 Determinação das variáveis respostas do planejamento fatorial 2³ (Coeficiente de partição (K), Rendimento (Y), e Fator de purificação (FP))

Todos os parâmetros analisados pós-extração da protease e da protease com atividade colagenolítica, tais como: coeficiente de partição (K), rendimento de extração (Y) e fator de purificação (PF) foram determinados de acordo com Fernandes et al. 2020.

O coeficiente de partição (K) é definido como a razão da atividade volumétrica na fase superior (AT) e na fase inferior (AB) (equação 1)

$$\text{Equação 1: } K = \frac{A_t}{A_b}$$

O rendimento da atividade (Y, %) foi definido como a razão entre a atividade total (AT ou B) e o volume (VT ou B) nas fases superior ou inferior para a atividade (ACE) e o volume (VCE) do extrato bruto e expresso em porcentagem (equação 2):

$$\text{Equação 2 } Y = \frac{A_{(T \text{ or } B)} V_{(T \text{ or } B)}}{A_{CE} V_{CE}} * 100$$

O fator de purificação (FP) é definido como a média entre a atividade específica da fase superior ou inferior (S(T ou B)) e a atividade específica do extrato bruto (SCE)

(equação 3).

$$\text{Equação 3: } FP = \frac{S_{(T \text{ ou } B)}}{S_{CE}}$$

Onde S é igual a razão entre a atividade enzimática determinada na fase superior, inferior ou no extrato bruto, e sua respectiva concentração proteica.

2.4 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados foram estatisticamente analisado utilizando o ANOVA, seguido por teste de Tukey. Diferenças entre os grupos foram aceitos como significativos a um nível de confiança de 95% ($p < 0,05$).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

O extrato bruto (EB) obtido a partir das vísceras intestinais da Tainha (*Mugil Liza*) apresentou as seguintes atividades: proteínas totais 1,02 U/mg; atividade colagenolítica: 152,0 U/mg volumétrica; 161 U/mg de atividade colagenolítica específica; 7,35 U/mL de atividade proteolítica/proteásica; e, por fim, 14,2 mg/mL de atividade proteolítica específica. Esses valores de atividade colagenolítica específica foram superiores aos relatados por Nayak et al. (2020) em estudo com peixe-panga (*Pangasianodon hypophthalmus*), tilápia (*Labeo rohita*) e carpa (*Cyprinus carpio*) onde reportaram atividades colagenolítica de 29,67, 16,87 e 20,17 (U/ml)

3.1 Extração de proteases e proteases colagenolíticas por sistemas de duas fases aquosas (SDFA) PEG/citrato

A matriz do planejamento fatorial 2^3 para extração de proteases e proteases colagenolíticas (Figura 1) presentes no extrato bruto de *Mugil liza* por sistemas de duas fases aquosas SDFA- PEG/Citrato, bem como, os resultados experimentais das variáveis respostas: coeficiente de partição (K), rendimento da extração (Y) e fator de purificação (FP) são apresentados na Tabela 2. Como pode ser observado, nos ensaios 1 e 3 formados por PEG com a menor massa molar (400 g/mol) e concentração de citrato 15 % não houve formação de sistemas bifásicos, visto que, nesses ensaios a concentração do polímero e do sal ficaram abaixo da curva binodal obtida para PEG 400 g/mol já descrita por Porto et al. (2007).

Figura 1. Tratamento biotecnológico de resíduos de Tainha (*Mugil liza*) pela técnica do sistema aquoso bifásico ATPS-PEG/Citrato.

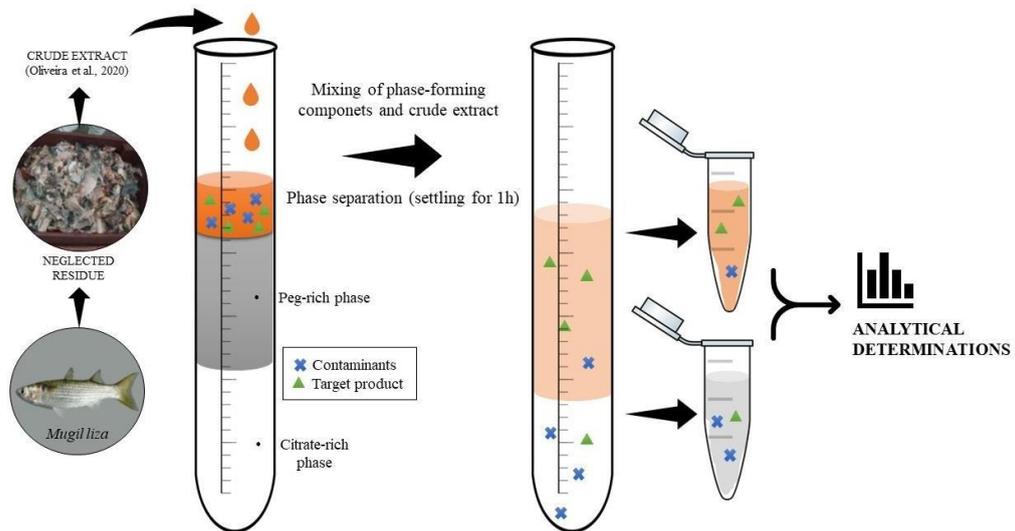


Tabela 2. Matriz de planejamento fatorial completo (2³) com condições e resultados da partição da protease e da protease colagenolítica.

Matriz				Protease			Protease Colagenolítica		
Run s	MPEG (g/mol)	CPE G (%)	Ccit (%)	KP	YP (%)	FP	KC	YC (%)	FPC
1	400	20	15	*	*	*	*	*	*
2	8000	20	15	1.60	83.45	1.45	1.77	422.04	0.78
3	400	24	15	*	*	*	*	*	*
4	8000	24	15	5.76	121.14	1.45	2.97	435.61	1.17
5	400	20	20	4.29	81.00	0.58	5.30	299.10	1.12
6	8000	20	20	2.92	67.87	1.18	3.44	355.68	0.66
7	400	24	20	6.78	121.38	0.78	4.52	242.11	1.21
8	8000	24	20	3.22	59.00	1.22	4.95	378.38	0.59
9	3350	22	17,5	5.93	122.38	1.38	1.76	344.84	0.89
10	3350	22	17,5	6.24	124.34	1.35	2.38	391.55	1.04
11	3350	22	17,5	5.89	123.19	1.32	1.91	363.72	1.12

MPEG (g/mol) = Massa molar do Polietileno Glicol (PEG) em g/mol.

CPEG (%) = Concentração de PEG

Ccit (%) = Concentração do citrato

KP= Coeficiente de Partição da Protease

YPPEG = Rendimento da Protease na fase rica em PEG

FPP = Fator de purificação da protease na fase rica em PEG

KC = Coeficiente de Partição da Colagenase

YcPEG = Rendimento da Colagenase na fase rica em PEG

FPC = Fator de purificação da Colagenase na fase rica em PEG

* = Não houve formação de fases

Em todos os ensaios onde houve formação de fases as proteases e proteases colagenolíticas presentes no extrato bruto foram extraídas para fase polimérica dos sistemas bifásicos (K_p e $K_c > 1$). A análise estatística dos resultados obtidos (Tabela 3) mostrou que para o coeficiente de partição da protease (K_p) todas as variáveis independentes foram estatisticamente significativas, assim como, as interações entre as variáveis 1x3 (MPEG x Ccit) e 1x2x3 (MPEG x CPEG x Ccit). Sendo mais proeminente o efeito negativo da interação antagônica entre a MPEG e da Ccit (1x3), indicando que a redução da massa molar do polímero simultaneamente com o aumento na concentração do sal favoreceu a partição da protease para fase rica em PEG. Em contrapartida, para o coeficiente de partição obtido para proteases com atividade colagenolítica (K_c) apenas a variável independente concentração de citrato (Ccit) foi positivamente significativa para partição enzimática, indicando que uma maior concentração de sal favoreceu a partição enzimática para fase polimérica. Este comportamento é conhecido como efeito Salting out, onde o aumento da concentração de sal na fase inferior do sistema diminui a solubilidade das proteínas nesta fase, direcionando a partição da biomolécula para a fase oposta (Fernandes et al., 2020; Da Silva et al., 2017).

Tabela 3. Efeito calculado das variáveis-respostas da fase superior no planejamento fatorial 2³ para a partição e extração da protease e protease colagenolítica de *Mugil lisa* por PEG-Citrato ATPS usando ATPS.

Variáveis e interações	Efeitos estimados					
	KP	YP	PFP	KC	YC	PFC
(1) MPEG	4.48*	46.34*	46.43*	3.62	15.80*	2.63
(2) CPEG	12.83*	24.84*	2.83	2.11	-0.31	1.24
(3) CCIT	18.18*	44.75*	10.14*	14.72*	6.28*	4.94*
1 x 2	3.64	-4.15*	-1.88	3.81	1.40	0.69
1 x 3	-22.68*	-100.55*	21.92*	-6.74*	-10.00*	-9.17*
2 x 3	-2.53	-2.22	2.83	-0.51	-0.72	-1.12
1 x 2 x 3	-11.72*	-31.21*	-1.88	1.19	0.99	-1.66

MPEG = PEG molar mass,

CPEG = PEG concentration,

Ccit = Citrate concentration,

KP = Partition Coefficient of protease

YP = Protease activity yield of top phase,

PFP = Protease purification factor of top phase.

KC = Partition Coefficient of collagenolytic protease

YC = Collagenolytic protease activity yield of top phase,

PFC = Collagenolytic protease purification factor of top phase.

* Statistically significant at the 95% confidence level, $p < 0.05$.

Os rendimentos da extração (Y) obtidos variaram de 89 a 124,34% e de 242,11 a 435,61% para protease e proteases com atividade colagenolítica, respectivamente (Tabela 2). Valores de rendimento de atividade enzimática superiores a 100% são constantemente relatados na literatura em extrações utilizando sistemas bifásicos, isto deve-se a possível remoção de contaminantes e inibidores da atividade para fase oposta ou por alterações induzidas pelo PEG no sítio ativo da enzima favorecendo a atividade enzimática (SILVA et al., 2020). Desta forma, vale ressaltar que o SDFa PEG/citrato conferiu um ambiente propício para extração de enzimas obtidas de *Mugil liza* principalmente para proteases com atividade colagenolíticas.

Estatisticamente, ao nível de confiança de 95%, $p < 0,05$ (Tabela 3), todas as variáveis independentes foram significativas para o rendimento da atividade proteásica (YPPEG), e apenas a interação de segunda ordem (2x3) entre a CPEG e Ccit não apresentou efeito significativo para esta resposta. A interação entre a MPEG e a Ccit (1x3) apresentou um forte efeito negativo e antagônico (Figura 2), ou seja, os maiores valores de rendimentos da protease foram obtidos quando houve uma diminuição e um aumento simultâneo da MPEG e da concentração do sal, respectivamente.

Já para proteases com atividade colagenolíticas a análise estatística dos resultados de rendimento (YCPEG) mostraram que a variável independente MPEG apresentou um forte efeito positivo sob esta resposta, ou seja, um aumento na massa molar do polímero favoreceu o rendimento da atividade enzimática na fase superior do sistema, indicando uma interação entre o polímero e a enzima. Um aumento na massa molecular do PEG reduz o volume livre devido ao aumento do comprimento da cadeia do polímero, geralmente resultando na partição das biomoléculas para a fase inferior (efeito do volume excluído) (GOJA et al., 2013).

Todavia, em virtude do aumento da massa molar do PEG ocorre também um aumento na hidrofobicidade da fase, levando conseqüentemente a um aumento nas interações hidrofóbicas entre o polímero e a proteína alvo, desta forma, enzimas que apresentam em sua estrutura muitos grupos hidrofóbicos, tendem a serem extraídas na fase superior do sistema. Proteases colagenolíticas possuem em sua estrutura regiões hidrofóbicas que favorecem a sua interação com o PEG, portanto, os resultados obtidos no presente trabalho corroboram com resultados anteriores para extração dessas enzimas obtidas a partir de diferentes fontes empregando a mesma técnica de separação (SILVA et al., 2020; ROSSO et al., 2013).

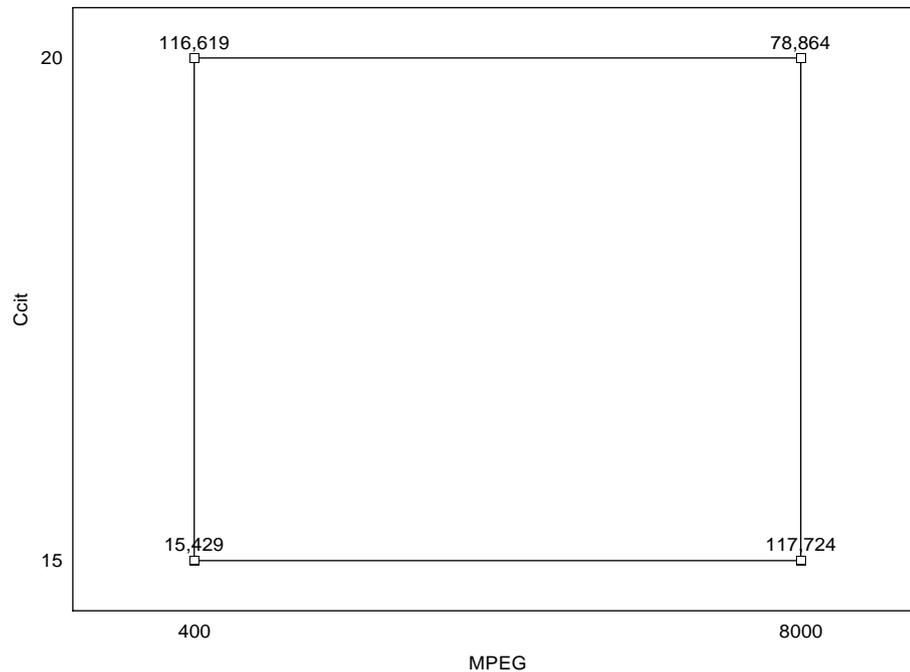


Figura 2. Diagrama de interpretação geométrica da interação entre a massa molar de PEG (MPEG, g/mol) e a concentração de citrato (Ccit, % m/m) sob o rendimento da atividade de protease (YPPEG) extraída de *Mugil lisa* na fase superior (rica em PEG) do sistema de duas fases aquosas (SDFA)

Os resultados experimentais do fator de purificação obtido para protease (FPP = 1,45) e para proteases colagenolíticas (FPC = 1,21) (Tabela 1) são inferiores aos relatados por Oliveira et al., 2020 quando realizaram a extração de proteases colagenolíticas de tucunaré (*Cichla ocellaris*) utilizando SDFA (FP = 8,24) e aos descritos por Silva et al 2020 na extração de proteases colagenolíticas obtidas a partir de resíduos de robalo-flecha (*Centropomus undecimalis*) (FP = 3.91), contudo, condizem com os resultados obtidos em técnicas de pré-purificação e pré-tratamentos de resíduos podendo ser empregada em etapas iniciais do processamento downstream, dado que, esta técnica pode ser aplicada em curto tempo, e reduz a chance de modificação ou degradação indesejável da biomolécula (Phong et al., 2018).

O FPP foi significativamente influenciado (nível de confiança de 95% e $p < 0,05$) pelas variáveis independentes MPEG e Ccit que apresentaram efeito positivo, e pela interação entre essas duas variáveis (1x3) com efeito significativo e antagônico para esta variável resposta (Tabela 3). Considerando a análise estatística realizada para o fator de purificação obtido para protease colagenolítica (PFC) apenas a variável independente Ccit influenciou positivamente esta resposta. A interação entre a MPEG e a Ccit também teve influência negativa e antagônica sob o PFC, dado que, o aumento da MPEG e a diminuição simultânea da Ccit favoreceram a purificação enzimática na fase superior do sistema.

4. CONCLUSÃO

Neste estudo foi possível observar que a protease colagenolítica foi extraída e semi-purificada com sucesso de vísceras internas de Taíinha, usando o método de partição bifásica. Por ser uma técnica rápida e simples quando comparada aos métodos cromatográficos mais aprimorados, foi possível comprovar sua viabilidade para aplicação em larga escala em resíduos da pesca. Essa técnica de semipurificação foi aplicada nos em todos os resíduos intestinais, que demonstrou ser eficaz para recuperação de enzimas com potencial para aplicação industrial, sugerindo também, que esse processo é também eficaz para reduzir o impacto ambiental que o descarte inadequado desses resíduos provocam.

AGRADECIMENTOS

Este estudo foi financiado em parte pela Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) e pela Fundação de Amparo a Ciência e Tecnologia do Estado de Pernambuco (FACEPE).

REFERÊNCIAS

- C.L. Ginther (1979) Sporulation and the production of serine protease and cephamycin C by *Streptomyces lactamdurans*. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 15, pp. 522-526
- Da Silva, O. S., Gomes, M. H. G., de Oliveira, R. L., Porto, A. L. F., Converti, A., & Porto, T. S. 2017. Partitioning and extraction protease from *Aspergillus tamaris* URM4634 using PEG-citrate aqueous two-phase systems. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 9, 168-173.
- Fernandes, L. M. G., Carneiro-da-Cunha, M. N., de Carvalho Silva, J., Porto, A. L. F., & Porto, T. S. (2020). Purification and characterization of a novel *Aspergillus heteromorphus* URM 0269 protease extracted by aqueous two-phase systems PEG/citrate. *Journal of Molecular Liquids*, 317, 113957.
- Goja, A.M., Yang, H., Cul, M., Li, C. 2013, Aqueous two-phase extraction advances for bioseparation, *J. Bioprocess. Biotech.*, 4, p. 140
- Neto, B. B., Scarminio, I. S., & Bruns, R. E. (2010). *Como Fazer Experimentos-: Pesquisa e Desenvolvimento na Ciência e na Indústria*. Bookman Editora.
- Oliveira, V.M.; Cunha, M.N.C.; Assis, C.R.D.; Silva, J.M.; Nascimento, T. P.; Santos, J.F.; Duarte, C.A.L.; Marques, D.A.V.; Bezerra, R.S.; Porto, A.L.F. 2020. Separation and partial purification of collagenolytic protease from peacock bass (*Cichla ocellaris*) using different protocol: Precipitation and partitioning approaches. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 24: 1-13. <http://dx.doi.org/10.1016/j.bcab.2020.101509>.
- Phong, W. N., Show, P. L., Chow, Y. H., & Ling, T. C. 2018. Recovery of biotechnological products using aqueous two-phase systems. *Journal of bioscience and bioengineering*, 126(3), 273-281.
- Rosso, B.U.; Lima, C.D.A.; Porto, T.S.; Nascimento, C.O.; Pessoa, A.; Converti, A.; Carneiro-da-Cunha, M.D.G.; Porto, A.L.F. 2012. Partitioning and extraction of collagenase from *Penicillium aurantiogriseum* in poly(ethylene glycol)/phosphate aqueous two-phase system. *Fluid Phase Equilibria*, 335: 20-25. <http://dx.doi.org/10.1016/j.fluid.2012.05.030>.
- Silva, J. C., Lino, L. H. S., Da Cunha, M. N. C., Da Silva Batista, J. M., Oliveira, V. M., & Porto, A. L. F. 2021. Extraction of collagenolytic enzyme from fish viscera by

phase partitioning (peg/citrate) and its potential for industrial application. Boletim do Instituto de Pesca, 46(4).

Stasoft, I., 2008. STATISTICA (Data Analysis Software Systems) Version 8.0.

T.S. Porto, P.A. Pessôa-Filho, B.B. Neto, J.L.L. Filho, A. Converti, A.L.F. Porto, A. Pessoa, Removal of proteases from *Clostridium perfringens* fermented broth by aqueous two-phase systems (PEG/citrate), J. Ind. Microbiol. Biotechnol., 34 (2007), pp. 547-552, 10.1007/s10295-007-0230-8.

CAPITULO 2

ARTIGO II: Métodos biotecnológico para produção de peptídeos de colágeno de origem marinha e suas aplicações industriais: uma breve revisão

Artigo nas normas do periódico Marine Drugs

Fator de impacto: 2.853



Métodos biotecnológico para produção de peptídeos de colágeno de origem marinha e suas aplicações industriais: uma breve revisão

Quésia Jemima da Silva^a, Vagne de Melo Oliveira^a, Jéssica Costa da Silva^a, Beatriz Aquino, Juanize Matias da Silva Batista^a, Ana Lúcia Figueiredo Porto^{a*}

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

* Autor de Correspondência:

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

Tel: + 55 (81) 3320.634

RESUMO

Os peptídeos de colágeno de peixe são importantes no mercado global de peptídeos de colágeno e tem importancia no desenvolvimento de biomateriais que constituem produtos farmacêuticos, cosméticos e alimentícios. As características químicas e propriedades biológicas e funcionais desses peptídeos, os tornaram uma ferramenta atraente e flexível com diversas aplicações. As características biológicas desses compostos são análogas aqueles recuperados de bovinos e suínos, podendo ser facilmente substituídos. Atualmente, existem vários problemas relacionados ao manejo adequado de subprodutos de pescado, para o qual a recuperação de biocompostos desses, pode fornecer uma solução possível. Por isso, é pertinente reunir atualizações sobre as possíveis aplicações de peptídeos de colágeno. Com isso esta revisão reúne diferentes aspectos do peptídeo de colágeno, como classificação, propriedades, métodos de preparação, e aplicações em diferentes indústrias. Engloba especificamente os peptídeos de colágenos aplicados na indústria farmacêutica, de cosméticos e de alimentos. Além disso, enfatiza os aspectos regulatórios do peptídeo de colágeno comercial destacando as informações relacionadas a determinados ingredientes. Abrangendo também patentes e produtos de peptídeos de colágeno comerciais existentes com indicações. Esta revisão traz informações sobre peptídeos de colágeno com aplicações industriais abrangendo aspectos essenciais para realização de futuras pesquisa neste campo específico.

Palavras chave: resíduo de peixe, biotecnologia, peptídeos de colágeno, biocompostos.

ABSTRACT

Fish collagen peptides are important in the global collagen peptides market and are important in the development of biomaterials that constitute pharmaceutical, cosmetic and food products. The chemical characteristics and biological and functional properties of these peptides have made them an attractive and flexible tool with diverse applications. The biological characteristics of these compounds are similar to those recovered from cattle and swine, and they can be easily substituted. Currently, there are several problems related to the proper management of fish products, for which the recovery of biocompounds from these products can provide a possible solution. Therefore, it is pertinent to gather updates on the possible applications of collagen peptides. Thus, the objective of this review brings together different aspects of collagen peptide, such as classification, properties, preparation methods, and applications in different industries. It specifically encompasses collagen peptides applied in the pharmaceutical, cosmetics and food industries. In addition, it emphasizes the regulatory aspects of commercial collagen peptide by highlighting information related to certain ingredients. Also covering patents and existing commercial collagen peptide products with indications. This review provides information on collagen peptides with industrial applications covering essential aspects for future research in this specific field.

Keywords: fish waste, biotechnology, collagen peptides, biocompounds.

1. INTRODUÇÃO

O mercado global de peptídeos de colágeno foi impulsionado pelo aumento da conscientização sobre os benefícios destes compostos para a saúde. Há uma crescente utilização de peptídeos de colágeno como suplementos alimentares em alimentos e bebidas, bem como componentes bioativos em cosméticos, biomedicina e produtos farmacêuticos (HONG et al., 2019). Com isso, aumentando a oportunidade de crescimento para o mercado de peptídeos nos próximos anos podendo atingir a marca de US\$ 1.169,5 milhões de dólares até 2027, com uma taxa de crescimento anual de 8,1% (MARKET, 2020).

Os peptídeos de colágeno são produtos da hidrólise enzimática ou química de colágenos de origem animal, principalmente de tecidos bovinos e suínos, o que pode ser motivo de preocupação, especialmente devido a restrições religiosas relacionadas à evasão de alguns produtos animais e à transmissão de doenças como a encefalopatia espongiforme bovina (BSE). Nesse contexto, o colágeno alternativo tem sido explorado, incluindo aqueles extraídos de peixes pele e escamas (RAHMAN et al. 2019). Com isso, peptídeos de colágeno de peixes são uma alternativa aos seus homólogos de mamíferos, pois são aceitos por grupos religiosos e seguros biologicamente.

A indústria de processamento de pescado é responsável por grandes quantidade de resíduos como barbatanas e escamas, que são utilizadas produção de peptídeos de colágeno, impulsionando o crescimento do mercado de peptídeos de colágeno. Os compostos extraídos de resíduos de peixe formam uma classe de peptídeos bioativos com estruturas específicas e atividade biológica que são determinadas a partir da sua composição e sequência de aminoácidos, determinando, assim, às suas diversas aplicações como ingrediente funcional nas indústrias (LI et al., 2022; DALIRI et al., 2018).

Recentemente, vários relatos de atividades biológicas foram descritos, incluindo atividade anti-hipertensiva (ERDENE et al., 2021), anticoagulante (NASRI et al., 2017), antioxidante (LOU et al., 2022), antimicrobiano (LI et al., 2022), hipoglicemiante (WU et al., 2022), antitumoral (SONG et al., 2022) e capacidade de redução do colesterol (UDENIGWE; ROUVINEN-WATT, 2015). Estudos têm fornecido evidências adequadas sobre a produção, otimização, identificação, composição e sequência de peptídeos bioativos de colágeno (ACQUAH et al., 2019; SEMREEN et al., 2018).

Portanto esta revisão reúne diferentes aspectos do peptídeo de colágeno,

como classificação, propriedades, métodos de preparação, e aplicações em diferentes indústrias. Engloba especificamente os peptídeos de colágenos aplicados na indústria farmacêutica, de cosméticos e de alimentos. Além disso, enfatiza os aspectos regulatórios do peptídeo de colágeno comercial destacando as informações relacionadas a determinados ingredientes. Abrangendo também patentes e produtos de peptídeos de colágeno comerciais existentes com indicações. Esta revisão traz informações sobre peptídeos de colágeno com aplicações industriais abrangendo aspectos essenciais para realização de futuras pesquisas neste campo específico.

1. METODOLOGIA

Para realização desta pesquisa as buscas foram realizadas nas bases de dados Science Direct e Scopus aplicando as seguintes palavras chaves: Peptídeo de Colágeno; Obtenção de Peptídeos de Colágeno; Purificação de Peptídeos; Caracterização de Peptídeos; Aplicação Industrial. No período de janeiro a junho de 2022 (Tabela 1). Após o levantamento bibliográfico, dois pesquisadores independentes analisaram, independentemente, os títulos e resumos dos estudos selecionados e identificaram os artigos potenciais a serem incluídos nesta revisão, analisando os critérios de inclusão e exclusão. Os estudos selecionados foram posteriormente revisados por um terceiro pesquisador, durante a triagem do texto completo, aqueles que não seguiram os critérios de elegibilidade foram excluídos.

Critérios de inclusão para seleção dos artigos: Estudos com peptídeos de colágeno extraídos de resíduos de diferentes espécies de peixe; Estudos relatando a purificação e identificação de peptídeos de colágeno de peixe; Estudos sobre a aplicação do peptídeo de colágeno de peixe nas diferentes indústrias; Os artigos devem ser escritos em inglês e publicados nos últimos 5 anos (2017-2022). Critérios de exclusão para seleção dos artigos: Ensaios clínicos, estudos in vitro, estudos in situ, relatos de casos; Estudos no qual os peptídeos de colágeno não foram aplicados na indústria; Estudos com resíduos de outras espécies marinhas; Falta de descrição de metodologia ou resultados.

O levantamento de patentes foi realizado através da plataforma INPI (Instituto Nacional da Propriedade Industrial) e Google patentes utilizando as palavras chaves: peptídeo de colágeno de peixe.

2. ASPECTOS FÍSICO-QUÍMICOS E ESTRUTURAIS DO COLÁGENO E SUAS CARACTERÍSTICAS

O colágeno é uma proteína fibrilar, principal componente da matriz extracelular, presente em diferentes formas de tecidos como o conjuntivo, o tecido ósseo, cartilagem, tendão e pele (SONG et al., 2018; FU et al., 2018). O colágeno é formado por fibrilas insolúveis e altamente resistentes que podem induzir ou regular muitas funções e processos estruturais e celulares, como diferenciação, movimento, comunicação e apoptose (YANG et al., 2021; AHMED; VERMA; PATEL, 2020). Até o momento foram identificados 29 tipos diferentes de colágeno em humanos, cada um codificado por um gene. No entanto, os vários tipos de colágenos têm composições de aminoácidos diferentes, o que permite realizar funções específicas do corpo. Os principais tipos de colágeno são o tipo I (todos os tecidos e órgãos), tipo II (exclusivo para cartilagem), tipo III (pele, vasos sanguíneos e órgãos), tipo IV (membranas basais como sistema de filtração) e tipo V (todos os tecidos como citoesqueleto) (POZZOLINI et al., 2018).

Os colágenos tipo I, II e III são os mais abundantes e bem investigados para uso biomédico, como material na engenharia de tecidos, sutura cirúrgica absorvível, preenchimento ósseo, material osteogênico, agente hemostático, imobilizador enzimático e curativo de queimaduras e/ou feridas (FURTADO et al., 2022). Na indústria farmacêutica, são transformados em compostos que prolongam a ação de drogas (MATSUMOTO et al., 2015; POZZOLINI et al., 2018) e na engenharia de tecidos, atuam como uma estrutura natural para a reconstrução de tecidos (especialmente tipo I) (QUIN et al., 2021; CHIE et al., 2022). Essas funções são devidas às propriedades do colágeno como proteína.

O colágeno tipo I é o mais enfatizado devido à sua capacidade de formar fibrilas com comprimento de 300 nm e diâmetro fibrilar de até 1000nm. Este tipo de colágeno é trimérico $[(\alpha 1)_2\beta 2]$ e existe naturalmente como uma hélice tripla. Essas hélices têm repetições “Gly-X-Y” (onde X e Y principalmente Pro e Hyp). Assim, a prolina e hidroxiprolina, comumente conhecidos como iminoácidos, constituem cerca de 23% do total de proteínas sequência, e a estrutura Gly-Pro-Hyp é a forma mais comum frequentemente baseada (DOMENE; JORGENSEN; ABASSI, 2016; WAHYUDI et al., 2016).

O colágeno foi isolado de vários animais e até mesmo de plantas. A principal fonte de colágeno são os tecidos de mamíferos. O colágeno derivado da placenta humana e da pele podem ser encontrados comercialmente, a um custo

mais elevado (RODRÍGUEZ et al., 2018). Ao longo dos anos, ossos e peles de bovinos e suínos são extraídos e aplicados em escala comercial pela indústria. No entanto, o risco de contaminando por doenças altamente infecciosas e contagiosas como a Encefalopatia Espongiforme Transmissível (EET), Encefalopatia Espongiforme Bovina (BSE- Mad Cow Disease) e Febre Aftosa (FMD) juntamente com as barreiras religiosas para o uso de colágeno de suínos e bovinos têm gerado preocupação (FELICIAN et al., 2018).

Assim, o colágeno de origem marinha tem sido utilizado como uma fonte alternativa segura e atraente em relação aos seus análogos terrestres, com baixa toxicidade, alta biocompatibilidade e baixo risco de doenças transmissíveis (FELICIAN et al., 2018). A utilização de resíduos produzidos no processamento de pescado para extração de colágeno, não pode ser desconsiderada, pois esta é praticada em muitos países como uma solução para a demanda crescente de colágeno no mercado e também uma solução para a poluição do meio ambiente (COELHO et al., 2017). Estudos recentes demonstram que resíduos como pele, barbatanas, escamas e vísceras são importantes fontes de colágeno com potencial aplicação em diferentes indústrias (REÁTEGUI-PINEDO et al., 2022; CHEN et al., 2022; SAMIMIAZAD; EHSANI; SHABANI, 2022)

Além dessa extrema diversidade de tecidos e tipos de colágeno, é importante desenvolver um método de extração padrão para todos os tipos de colágeno e suas diferentes fontes.

3. CARACTERIZAÇÃO DE COLÁGENO

Os vários tipos de colágeno podem ser isolados de diferentes fontes, como os resíduos de peixe. Em geral, os materiais são suspensos em água destilada fria por 2-3 dias, cortados em pequenos pedaços (cerca de 1 cm de comprimento), com troca de água duas vezes ao dia (12/12 horas). Para isolar o colágeno, vários métodos têm sido utilizados, como a extração com sal, ácido e soluções enzimáticas (BAI; WEI; REN, 2017; TAN; CHANG, 2018; ARUMUGAM et al., 2018).

O método de precipitação em sal foi um dos os procedimentos de extração de colágeno baseados no tratamento de peças com soluções salinas neutras. A partir deste processo o colágeno é isolado e a concentração de cloreto de sódio (NaCl) é aumentada gradualmente. O sobrenadante, contendo a fração de colágeno solúvel em sal, pode ser dialisado (IDEIA et al., 2020). Quando se trata de isolamento, o método utilizando ácido, é também comumente utilizado e baseia-se na extração de

colágeno de subprodutos com Ácido orgânico. Após este processo, o sobrenadante contendo fração de colágeno solúvel em ácido, pode ser como no método do sal (SOUSA et al., 2020).

O método de isolamento enzimático é baseado na extração de colágeno com um ácido orgânico na presença de pepsina. Os sobrenadantes das soluções extraídos são salgados com NaCl, e o precipitado obtido (conteúdo em colágeno puro) é dissolvido em ácido acético. Em seguida, a solução foi dialisada em solução de fosfato de sódio (Na_2HPO_4) (ARUMUGAM et al., 2018). Segundo Arumugam et al. (2018) depois de ter testado vários procedimentos de isolamento de colágeno, notou-se que a eficiência da extração do sal básico é baixa. Além disso, a capacidade de solubilização pode ser obtida aumentando a concentração de sal, o que aumentará o poder iônico da solução obtido. No entanto, em tecidos normais, a proporção de colágeno solúvel em sal neutro geralmente é sem importância, então o rendimento final é muito baixo.

O método alternativo utilizado para garantir a extração é baseado na solubilização com ácido orgânico diluído ácido acético ou ácido cítrico usado como solvente o ácido acético na presença de EDTA, que inibe efetivamente a degradação do tecido (OSLAN et al., 2022). Claramente, em comparação, este método tem uma maior capacidade de solubilizar o colágeno do que a extração de sal neutro, mas ainda é limitada a jovens colágeno não reticulado (SCHMIDT et al., 2016).

4. PEPTÍDEOS DE COLÁGENO

Peptídeo de colágeno consiste em uma pequena cadeia de peptídeos com 2-20 resíduos de aminoácidos obtidos após hidrólise do colágeno. É consenso que os peptídeos de colágeno, especialmente, os tripeptídeos apresentam melhores propriedades físicas, químicas e funcionais do que o colágeno. Estudos mostraram que a biodisponibilidade do colágeno é de cerca de 50% *in vivo*, devido ao seu baixo peso molecular facilitando a absorção desses compostos (WANG et al., 2015). Devido a essa biodisponibilidade, os peptídeos apresentam efeitos benéficos sobre o sistema gastrointestinal, cardiovascular, imunológico e nervoso, bem como outros biomarcadores associados à gestão da saúde humana (ACQUAH et al., 2019; KLEEKAYAI et al., 2020).

Os peptídeos de colágeno são compostos formados por 2 a 20 aminoácidos em sequências que são liberados do colágeno de origem através de mecanismos como hidrolises, com possíveis atividades biológicas. Vários métodos de extração

são utilizados para liberar peptídeos bioativos da proteína original, e estes incluem hidrólise ácida; hidrólise enzimática: usando enzimas para hidrolisar os subprodutos de peixe; e o método de fermentação: usando microorganismos como fonte de enzimas (Huang et al. 2015).

Com base nas publicações analisadas relacionadas aos benefícios para a indústria acima citadas, a análise foi conduzida separadamente usando palavras-chave como peptídeos de peixe com atividade antimicrobiana, peptídeos de peixe com atividade antioxidantes, peptídeos de peixe com atividade anti-hipertensivos, peptídeos de peixe com função antidiabéticos e peptídeos de peixe com função anticâncer.

5. FONTES DE PEPTÍDEOS DE PEIXE

Os peptídeos podem ser recuperados de três componentes principais de peixes: músculo (carne), pele e resíduos (que incluem cabeça, aparas, cartilagem, barbatanas, ossos, vísceras e ovas) (BUI et al., 2020). Os músculos de algumas espécies possuem componentes ricos em biocompostos, como proteínas, colágeno, gelatina e ácidos poli-insaturados, que devido a sua sensibilidade a oxidação tem seu valor limitado, por serem desagradáveis para o consumo e conseqüentemente para indústria, sendo processados em produtos de baixo valor de mercado como ração e farinhas de peixe (NAVARRO-PERAZA et al., 2020; PRABHA et al., 2019).

O músculo de peixe é utilizado para extrair peptídeos de colágeno e há numerosos estudos sobre a produção desses compostos usando esta fonte, como exemplo peixe sarda oriental (*Striped bonito*) (BUI et al., 2020); peixe serra (*Scomberomorus sierra*) (FIMBRES-ROMERO et al., 2021); enguia (*Muraenesox cinereus Forsskal, 1775*); enguia europeia (*Anguilla anguilla*) (CAO; SHI; WENG, 2019). A pele e os demais resíduos de peixes são subprodutos do processamento que são geralmente eliminados, no entanto, a conversão desses produtos ricos em peptídeos permite a elaboração de produtos alimentícios de alto valor (CARUSO, 2015), como os peptídeos produzidos de pele das espécies carpa mrigal (*Cirrhinus mrigala*) (MAHBOOB, (2015); peixe largato (*Saurida spp.*) (WANGTUEAI et al., 2016); peixe polaca do Alasca (*Gadus chalcogrammus*) (SUN et al., 2021); Bacalhau-do-Pacífico (*Gadus macrocephalus*) (NGO et al., 2016).

Além da pele e do músculo, estudos com outros subprodutos de peixes para produção de peptídeos de colágeno com função biológica foram realizados, tais como carpa rohu (*Labeo rohita*) (DAS; NAYAKA; DASH, 2021); escama de tilápia

vermelha (*Oreochromis sp.*) (SIERRA et al., 2021); de carpa do sul da Ásia (*Catla catla*), carpa comum (*Cyprinus carpio*), curimã (*Mugil cephalus*), carpa mrigal (*Cirrhinus mrigala*) (HARIKRISHNA et al., 2017); ossos de peixe carpa prateada (*Hypophthalmichthys molitrix*). Na Tabela 1 estão descritos estudos que demonstram a combinação dos diferentes processos tecnológicos para obtenção de peptídeos de colágeno de peixe com aplicação biológica.

6. MÉTODOS BIOTECNOLÓGICOS DE PRODUÇÃO DE PEPTÍDEOS

As técnicas aplicadas na produção de peptídeos de colágeno a partir de resíduos de peixe é uma questão importante para definir sua aplicação industrial. A aplicação de tecnologias adequadas de recuperação desses compostos visa aumentar o rendimento e a bioatividade dos peptídeos. Assim, a produção de peptídeos de colágeno envolve a identificação de fontes de proteína adequadas e a seleção de métodos de extração e purificação apropriados (WANG et al., 2017). Recentemente várias técnicas de produção de peptídeos foram desenvolvidas como fermentação, hidrólise enzimática e hidrólise química (WANG et al., 2017). A hidrólise enzimática é uma das técnicas mais utilizadas quando o objetivo é produzir peptídeos em larga escala com atividades específicas (ARUMUGAM et al., 2018; DALIRI et al., 2018). Como demonstrado na tabela.

Devido à estrutura helicoidal tripla dos colágenos, eles são resistentes às proteases comuns, mas podem ser facilmente clivados pela ação específica da enzima collagenase (PAL; SURESH, 2016). As collagenases (EC 3.4.24.7) são encontradas predominantemente em várias fontes como animais, plantas e microrganismos que diferem nas especificidades do substrato. As collagenases constituem um grupo de enzimas que hidrolisam as ligações peptídicas de vários tipos de colágeno, a proteína mais abundante em mamíferos, em condições ótimas de pH e temperatura *in vivo* e *in vitro* (BHAGWATA; DANDGE, 2018; SONG et al., 2021; LIU et al., 2021).

Estudos têm demonstrado que resíduos de organismos marinhos, como as vísceras de peixe, pode ser uma excelente fonte de enzimas colagenolíticas, evitando o desperdício por parte da indústria de processamento pesqueiro (HALIM et al., 2016; COPPOLA et al., 2021). O uso de vísceras de peixe traz uma vantagem sobre as enzimas comerciais, uma vez que os custos de produção podem ser bastante reduzidos e podem ser aplicadas para os mesmos fins por diferentes indústrias de processamento (OLIVEIRA et al., 2017).

As enzimas hidrolíticas, obtidas a partir de resíduos de pescados, são

capazes clivar as ligações peptídicas das moléculas de colágeno e subsequentemente degradá-las em pequenos peptídeos. As proteases podem ser classificadas de acordo com a sua capacidade de clivar ligações peptídicas, em exopeptidases, que hidrolisam ligações peptídicas próximas ao terminal amino (aminopeptidases) ou carboxipeptidases, enquanto as endopeptidases clivam ligações peptídicas distantes das extremidades aminoterminal e carboxiterminal; assim como também, podem ser classificadas com base no intervalo de pH da sua atividade ótima em enzimas ácidas, neutras e alcalinas (CEULEERS *et al.*, 2016). No entanto, ao longo dos anos métodos de obtenção de peptídeos de colágeno tem sido desenvolvido, com técnicas aprimoradas, como demonstrado na tabela 3.

Tabela 1. Métodos de recuperação de diferentes subprodutos de peixe de diferentes espécies

Subproduto	Espécie	Nome vulgar	Tipo de extração	Tipo de colágeno	Aplicação	Autor
Pele	<i>Tetraodontidae</i>	Baiacu	Ácida	Tipo I	Industria de alimentos	WANG <i>et al.</i> (2018)
Pele	<i>Mylopharyngodon piceus</i>	Carpa preta	Enzimática	-	Antioxidante	YAN <i>et al.</i> (2020)
Pele	<i>Siluriformes</i>	Bagre	Ácida	Tipo I	-	WANG <i>et al.</i> (2018)
Pele	<i>Oreochromis niloticus</i>	Tilápia do Nilo	Ácida/ enzimática	Tipo I	-	JHANG <i>et al.</i> (2016); CHEN <i>et al.</i> (2016)
Pele	<i>Labeo rohita</i>	Carpa Rohu	Ácida	Tipo I	Farmacêtica	RAMANATHAN <i>et al.</i> (2017)
Pele	<i>Cyprinus carpio</i>	Carpa-comum	Ácida	-	Farmacêutica	DUAN <i>et al.</i> (2018)
Pele	<i>Ictalurus punctatus</i>	Bagre americano	Ácida/ Enzimática	Tipo I	Industria de alimentos	ZHANG <i>et al.</i> (2019)
Pele	<i>Centropomus Undecimalis</i>	Robalo	Enzimática	-	Cosméticos	SINTHUSAMRAN; BENJAKU;

Pele	<i>Oncorhynchus nerka</i>	Salmão	Ácida/enzimática	Tipo I	Indústria de alimentos	NILSUWAN et al. (2022)
Escamas	<i>Cyprinus carpio</i>	Carpa-comum	Ácida	-	Farmacêutica	DUAN et al. (2018)
Escamas	<i>Sardinella brasiliensis</i>	Sardinha	Ácida	-	Farmacêutica	NAGAI et al. (2016)
Escamas	<i>Oreochromis niloticus</i>	Tilápia-do-Nilo	Ácida/ Enzimática	Tipo I	Industria farmaceutica	CHEN et al. (2019)
Escamas	<i>Oreochromis niloticus</i>	Tilápia	Enzimática/antibióticos	-	Indústria de alimentos	WHEI et al. (2022)
Escamas	<i>Oreochromis sp.</i>	Tilápia vermelha	Enzimática	Tipo I	Industria farmaceutica	SIERRA et al. (2021)
Pele	<i>Lophius litulon</i>	Tamboril	Enzimática	-	-	ZHANG et al. (2019)
Pele	<i>Cypselurus melanurus, Catla catla, Acanthocybium solandri, Clarias batrachus e Pangasius pangasius</i>	Cascudo, Catla, Cavala, Bagre e Panga	Enzimática	-	-	SIVARAVAM; SHANTHI (2021)
Pele	<i>Prionace glauca</i>	Tubarão Azul	Enzimática	Tipo I	Industria nutracêutica	SANCHES et al. (2018)
Escamas	<i>Oreochromis niloticus</i>	Tilápia do Nilo	Enzimática	Tipo I	Suplementação oral	WU et al. (2022)
Pele	<i>Oreochromis sp.</i>	Tilápia vermelha	Enzimática	Tipo I	Cosmético	LEE et al. (2022)

Pele	<i>H. Molitrix</i>	Carpa	Enzimática	-	Suplementação oral	TIAN; LI; LI (2021)
------	--------------------	-------	------------	---	--------------------	---------------------

7. HIDRÓLISE ENZIMÁTICA

A hidrólise enzimática é um método rápido, seguro e facilmente controlado de produção de peptídeos de colágeno. Esse é um método comumente utilizado para melhorar as propriedades biológicas e funcionais da proteína e de seus peptídeos (LUNA-VITAL et al., 2015). As proteases comerciais utilizadas para a produção de peptídeos de colágeno de peixe podem ser de diferentes fontes como microbianas (a exemplo flavourzyme, alcalase, neutrase, umamizyme, protamex); vegetais (exemplo bromelaina, ficina, papaína); e fontes animais (como tripsina, pepsina, quimiotripsina). A bioatividade dos peptídeos hidrolisados enzimaticamente depende de vários fatores, incluindo tipo de proteína, pré-tratamentos, especificidade enzimática e condições de hidrólise (pH, tempo, temperatura, relação sólido-líquido, relação enzima-substrato).

A especificidade da enzima é determinada pela sequência de aminoácidos em torno da ligação peptídica a ser hidrolisada. As condições de hidrólise e especificidade da enzima impactam na sequência de aminoácidos e no tamanho dos peptídeos produzidos. Alterações nas condições da hidrólise enzimática e quantidade de enzimas no processo resultam em na produção de peptídeos com diferentes atividades biológicas (GAO et al., 2020; GAO et al., 2020). Além das enzimas comerciais, estudos têm relatado a utilização de extratos de enzimas microbianas brutas, indicando a aplicação de novas fontes de protease para produzir novos peptídeos. Muitos métodos de hidrólise enzimática têm sido utilizados com sucesso em análises laboratoriais, mas não em nível industrial, em parte devido aos altos custos das enzimas utilizadas (GAO et al., 2020).

Ishak e Sarbon (2017) otimizaram o processo de hidrólise enzimática para produzir peptídeos com a função inibidora da enzima conversora de angiotensina I (ACE) a partir da proteína da barbatana de peixe cavalinha (*Decapterus Macrosoma*). Os fatores como temperatura (40, 50, 60 ° C), tempo (B: 60, 120, 180 min), pH (C: 7, 8, 9) e concentração enzima substrato (D: 1, 2, 3%) foram analisados no rendimento, grau de hidrólise (DH) e atividade inibidora de ACE. As amostras foram otimizadas usando a metodologia de superfície de resposta (RSM), que demonstrou boas condições para a produção de peptídeos bioativos com alta atividade inibitória da ECA.

Do mesmo modo, Nguyen et al. (2021) utilizaram o modelo de metodologia de superfície de resposta para otimizar as condições de hidrólise do colágeno da pele do atum amarelo (*Thunnus albacares*) para maximizar o grau de hidrólise (DH) e a

eficiência de recuperação de nitrogênio (NR). Os resultados mostraram que os parâmetros de hidrólise ideal foram 54,7°C e pH 8 com concentração de alcalase de 0,034 AU/g por 5,2 horas. Esses resultados sugeriram que os peptídeos de colágeno da pele do atum amarelo poderiam ser utilizados na produção de produtos alimentícios funcionais ou em outras indústrias relacionadas.

8. HIDRÓLISE QUÍMICA

Neste processo são utilizadas soluções ácidas ou alcalinas que hidrolisam as ligações peptídicas entre diferentes grupos de peptídeos na sequência da proteína. Especificamente, a hidrólise ácida é alcançada utilizando ácido clorídrico ou ácido sulfúrico sob altas temperaturas (121–138 °C) e pressão (220–310 mPa) por 2–8 h, seguido por neutralização para atingir pH de 6-7. O processo de hidrólise alcalina é conduzido sob baixas temperaturas (27-54 °C) usando vários sais alcalinos, como hidróxidos de cálcio, sódio ou potássio (BAI et al., 2017).

Embora o ácido sulfúrico seja comumente usado para hidrólise química, estudos com peptídeos de colágeno de peixe estão focados principalmente no uso de ácidos, como ácido nítrico, ácido fosfórico, ácido maleico e ácido oxálico (WANG et al., 2017). Recentemente, o ácido clorídrico é o mais comumente utilizado para hidrólise química desses peptídeos, porém, estudo sobre a cinética de liberação de peptídeos revelou uma liberação mais rápida, sugerindo que o padrão de liberação pode formar uma base para a produção de peptídeos (CHEN et al., 2018). No entanto, a hidrólise ácida tem várias desvantagens como alto teor de sódio e perda de nutrientes, como aminoácidos essenciais, como o triptofano, enquanto os reagentes alcalinos podem resultar na destruição de serina e treonina resultando em alterações nas propriedades funcionais e na geração de uma ampla gama de compostos indesejáveis (BAI et al., 2017).

Porém, ambos compostos, ácido clorídrico e hidróxido de sódio, ainda são frequentemente usados para hidrólise de proteínas na indústria devido à sua simplicidade e baixo custo (PETROVA; TOLSTOREBROV; EIKEVIK, 2018). Assim, a hidrólise de proteínas por agentes químicos não é indicada por ser um processo ecologicamente agressivo, pois envolvem produtos químicos altamente corrosivos, longo tempo de reação, modificação na cadeia de aminoácidos e alterações tanto química quanto nas propriedades funcionais (WANG et al., 2017).

9. FERMENTAÇÃO

A fermentação é um processo testado ao longo dos tempos e tem sido empregado na hidrólise de proteínas e na conservação de alimentos. Na indústria de alimentos, este processo potencializa sabor, textura, propriedades nutracêuticas dos alimentos, e auxilia na liberação de peptídeos bioativos, desenvolvendo as atividades microbiológicas e enzimáticas do meio. A bioatividade de vários produtos marinhos como pasta de camarão fermentado tailandês, subprodutos de camarão, missô de lula e outros produtos fermentados de peixe, foi relatada como resultado deste método.

Lopetcharat et al. (2021) rastream a presença de aminoácidos solúveis e de peptídeos isolados de hidrolisados de proteínas de músculo e de amostras viscerais de peixes. Da mesma forma, Majumdar et al. (2019) confirmaram a presença de propriedades microbianas e químicas em Shidal, um tradicional produto fermentado de peixe do nordeste da Índia. Shidal é rico em ácidos graxos como eicosapentaenóico, docosahexaenóico, araquidônico, linolênico e ácido linoleico (MAJUMDAR et al., 2019).

A fermentação envolve a incubação de materiais em um ambiente contendo tipos específicos de microrganismos (RAVESCHOT et al., 2018). Esses microrganismos secretam enzimas hidrolíticas que metabolizam constituintes específicos dentro dos materiais iniciais, produzindo assim hidrolisados. Em materiais ricos em proteínas, esses compostos são hidrolisados por proteases para gerar vários tipos de peptídeos (LEE et al., 2017). Ressaltando que esse é um processo seguro, verde e econômico que pode gerar vários peptídeos bioativos.

Estudos demonstram a viabilidade da obtenção de peptídeos bioativos de peixes ou seus subprodutos por fermentação, como por exemplo, a produção de peptídeos com a função de inibição da angiotensina (ACE) por fermentação da carne de atum (*Thunnus*) (WENNO et al., 2016). Em estudo com molho de peixe fermentado, Lee et al. (2017) obtiveram peptídeos com capacidade de reduzir níveis de colesterol (LEE et al., 2017). Peptídeos obtidos a partir da fermentação de peixes também têm sido comprovados por apresentar potente atividade antioxidante e antimicrobiana. Do mesmo modo, Najafian e Babji (2018) obtiveram peptídeos de colágeno com atividade antioxidante e antimicrobiana a partir de um preparado, extrato Badu, que tem como base a fermentação da pele de anchova (*Ilisha melastoma*) com bactérias de ácido láctico. Com isso, foi demonstrado o potencial de fermentação para a produção de peptídeos bioativos.

10. MÉTODO DE SÍNTESE

Os peptídeos bioativos de colágeno também podem ser produzidos usando o método de síntese química e recombinação genética. A síntese química envolve a preparação de peptídeos bioativos isolados com uma estrutura e sequência de aminoácidos conhecidas. Em geral, essa abordagem tem sido usada para sintetizar grandes quantidades de peptídeos com alta especificidade, como interferon, ocitocina, glutathiona e peptídeo de caseína (WANG et al., 2017).

As abordagens de recombinação genética integram um gene específico na sequência de DNA de outra espécie, que então expressa o polipeptídeo bioativo necessário, levando à geração de peptídeos com altos rendimentos e purezas. Abordagens de engenharia genética têm sido aplicadas para expressar a sequência de peptídeos de lunasina na soja, resultando em soja transgênica que teve melhor atividade anti-inflamatória do que a soja do tipo selvagem em um modelo de macrófagos induzidos pelo LPS (ALVARES et al., 2018). Em outro estudo, pesquisadores clonaram um peptídeo de toxina de escorpião que exibiram atividade imunossupressora e anti-inflamatória (XIAO et al., 2017).

Até o momento, há poucos exemplos dessas abordagens sendo usadas para produzir peptídeos hidrolisados de pele de peixes. Porém, quando se trata de peptídeos bioativos de peixe, o método de síntese é interessante, pois poderiam criar grandes quantidades puras.

11. SEPARAÇÃO E PURIFICAÇÃO DE PEPTÍDEOS BIOATIVOS

A purificação de peptídeos bioativos é um processo vital para identificação das estruturas e medir a atividade individual desses. Envolve uma série de processos eficientes de várias etapas com base nas características físicas e químicas de peptídeos, tais como tamanho molecular, carga, polaridade, solubilidade e interações covalentes ou não covalentes (AGYEI et al., 2017; AGYEI et al., 2019). Diversos métodos analíticos são amplamente utilizados para purificação de peptídeos bioativos incluindo sistemas de filtração por membrana, técnicas de cromatografia como cromatografia de afinidade, cromatografia em coluna de troca iônica (IEC), cromatografia líquida de ultra-alta pressão (UHPLC), interação hidrofílica de cromatografia líquida (HILIC), cromatografia líquida de alto desempenho de fase reversa (RP-HPLC) e eletroforese capilar (CE) (AHMED et al., 2018; ALUKO et al., 2018; GUO et al., 2015).

Além disso, tanto o grau de purificação quanto a sequência de peptídeo pode

ser confirmada por métodos de espectrometria de massa (MS); matriz assistida a laser como tempo de voo (MALDI-TOF); espectrometria de massa de ionização/dessorção a laser assistida por matriz (MALDI-MS); ionização por eletrospray - espectrometria de massa (ESI-MS); espectrometria de massa por bombardeio de átomo rápido (FAB-MS) (ABUINE et al., 2019; CHOI et al., 2018). Recentemente, a espectrometria de massa quadrupolo-tempo-de-vôo (Q-TOF MS), MALDI-TOF e ESI-MS tornaram-se técnicas de caracterização de peptídeos e proteínas bioativas (CHOI et al., 2018).

Das várias técnicas, a cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massa (LC-MS) é frequentemente usada para identificação de sequências de peptídeos (AHMED et al., 2018). No entanto, as técnicas acima mencionadas têm suas vantagens e/ou desvantagens com a precisão dependendo de razão m/z (massa para carga), estrutura química e sensibilidade de peptídeos (CHOI et al., 2018).

12. SISTEMAS DE SEPARAÇÃO POR MEMBRANA DE FILTRAÇÃO

O processo de separação por membrana envolve a permeação e retenção da amostra em um sistema de membrana impulsionado pela diferença de pressão. Este é o método mais amplamente utilizado para o isolamento de peptídeos bioativos de fontes alimentares (DLASK; VACLAVIKOVÁ, 2018). O processo é movido à pressão e é dividido em quatro categorias: a) microfiltração; b) ultrafiltração; c) nanofiltração; d) osmose reversa; que são baseados no tamanho dos poros da membrana. Destes, a ultrafiltração é o método mais rápido, econômico e ecologicamente correto (SUWAL et al., 2015) baseado na separação de peptídeos com limite de peso molecular específico (MWCO) (WANG et al., 2017).

Por exemplo, Wang et al. (2017) revisou a aplicação de filtração por membrana processo para purificação de peptídeos de peixe com baixo peso moléculas (MW) (> 3 a 5 kDa). Em um estudo posterior, Yang et al. (2020) produziu quatro peptídeos inibidores de MAO-A hidrolisados de proteína da pele de *Trichiurus japonicus*, purificados por ultrafiltração. Das quatro frações com peso molecular MW > 10 kDa, 5–10 kDa, 3–5 kDa e <3 kDa, o último (<3 kDa) mostrou maior atividade inibitória da MAO-A. Da mesma forma, usando a técnica de ultrafiltração, vários peptídeos bioativos de baixo peso molecular MW foram obtidos a partir cavalo-marinho (*Hippocampus abdominalis*) (<5 kDa) (JE et al., 2020) e *Decapterus maruadsi* (<5 kDa) (HU et al., 2020) com atividade biológica aumentada. No entanto,

os desafios existem para a técnica de filtração por membrana, como a interação entre a membrana semipermeável e os peptídeos hidrofóbicos, incrustação e obstrução da membrana, filtração de moléculas grandes e dificuldade em obtenção de peptídeos puros, bem como a necessidade de um grande volume de amostra.

13. TÉCNICAS CROMATOGRÁFICAS

A cromatografia é um importante método físico-químico usado para separação e purificação de compostos em uma mistura com base em sua interação e retenção com as fases móvel e estacionária. Baseado nas características moleculares de componentes específicos, eles são divididos em quatro técnicas de separação: troca iônica; adsorção líquido-sólido; partição líquido-líquido; e exclusão por tamanho (COSKUN, 2016).

Essas técnicas são geralmente são operadas em combinação com diferentes métodos, como UV, matriz de diodos, fluorescência e detectores de massa para identificação de uma grande variedade de componentes de fontes marinhas e de peixes. Mais especificamente, os peptídeos são detectados numa faixa de UV <220 nm usando colunas com material de empacotamento à base de sílica (pH 2–8). Embora seja técnicas demoradas e caras, seu nível de seletividade e alta resolução torna-as adequadas para separar e purificar uma ampla variedade de componentes em várias matrizes, incluindo peptídeos marinhos.

Je et al. (2020) obtiveram frações de peptídeos de colágeno de baixo peso molecular MW (<5 kDa) com atividade inibidora de ACE ($IC_{50} = 0,04 \pm 0,01$ mg / mL) isolado do cavalo-marinho (*Hippocampus abdominalis*) e produziram três peptídeos inibidores de ACE específicos (APTL, CAVPLSP e PTTPL) obtidos após separação por coluna Sepha dex® G-10 e identificados por Q-TOF MS. Alguns estudos discutiram técnicas cromatográficas e relataram sua eficiência para o isolamento e purificação de uma ampla variedade de peptídeos marinhos e de peixes. Além disso, sua combinação com diferentes tipos de técnicas avançadas fornecem uma maneira conveniente de separar, purificar e identificar peptídeos em grande quantidade (XU et al., 2020; WHANG et al., 2021).

14. ELETROFORESE CAPILAR

A Eletroforese capilar (EC) é uma técnica analítica usada para análise de peptídeos com base em valores m/z. Envolve o uso de um simples tubo capilar de sílica fundida (normalmente 100 cm x 100 µm) e possui a vantagem de alta velocidade, baixo consumo de solvente orgânico, operação de baixo custo, alta

eficiência, alta resolução e alta seletividade. Portanto, esta técnica é geralmente considerada como uma técnica complementar para métodos cromatográficos (KALUARACHCHI; LEWIS; LINDON, 2017). Dominguez-Veja et al. (2017) desenvolveram uma nova abordagem para determinar a composição de múltiplos peptídeos por espectrometria de massa (CE-MS/MS); assim como Wang et al. (2018) determinaram a ligação anticorpo-peptídeo local usando um ensaio CE para monitorar a formação do complexo antígeno-anticorpo em escala nanocelular e elucidar a interação entre as biomoléculas também.

Tabela 2. Lista de patentes de peptídeos de colágeno de resíduos de peixe.

Número	Número da patente/país	Título	Aplicação	Resumo	Ano
01	CN 104152518 B/China	Preparação de peptídeo de colágeno de pele de Bacalhau como suplemento para doenças hepáticas	de Suplemento dietético	Produção de peptídeo de colágeno com função reparadora hepática, a partir de subprodutos do processamento de Bacalhau, utilizando tripsina como método enzimático.	de 2017
02	CN 104250286 B/ China	Isolamento e caracterização de colágeno peptídeo de escamas de Corvina (<i>Pseudosciaena crocea</i>)	de aplicação em medicamentos, suplemento alimentar e aditivo alimentar	Identificação de um peptídeo de colágeno antioxidante: Phe-Ile-Gly-Pro-Trp, por hidrólise enzimática e identificação por cromatografia.	de 2017
03	CN 105734102 A/China	Método de preparação de peptídeo de colágeno	de Cosméticos	Preparação de peptídeo de colágeno através de hidrólise enzimática, sob diferentes temperaturas, com ação antimicrobiana.	de 2019
04	CN	Peptídeo	Industrial	A invenção	2017

106399436 A anticongelante
preparado por
alcoólise em uma
etapa

divulga um
método de
preparo de
peptídeo

anticongelante a
partir de pele de
peixe por hidrólise
enzimática, em
uma única etapa e
filtração por
membrana. Os
compostos
obtidos
apresentaram
atividade de
histerese térmica
maior do que os
anteriormente
isolados de pele
de frango e
porco.

05	CN 107365824 A/China	Método de Suplemento de preparo de alimentar de peptídeo de colágeno em pó	Método de 2017 obtenção de peptídeo de colágeno em pó, a partir de subprodutos de peixe, utilizando vários processos, como, ozônio, filtração. Após esses processos o extrato de hidrolisados de colágeno foi submetido a
----	----------------------------	---	---

				secagem por spray.	
06	CN 107619441 B/China	Método de preparação de esferas de cálcio queladas com peptídeos de colágeno	Indústria farmacêutica	A invenção fornece uma microesfera de cálcio quelado com peptídeo de colágeno obtido a partir de pele de peixe obtido a partir de solução com CaCl ₂ . A microesfera obtida a partir desta invenção tem a capacidade de quelar o cálcio através da ação do peptídeo de colágeno nas células epiteliais do intestino delgado, aumentando significativamente a absorção do cálcio pelo intestino.	2021
07	CN 108118077 A/China	Hidrólise enzimática de colágeno de Salmão para obtenção de peptídeos antioxidantes e anticongelantes	-	A invenção consiste em obter peptídeos de colágeno por hidrólise enzimática, com ação antioxidante e anticongelante,	2018

a partir de pele de salmão. O colágeno foi hidrolisado a partir de enzimas produzidas pela fermentação por *Vibrio sp.*SQS2-3, logo após centrifugados e ultrafiltrados, obtendo peptídeos com ação biológicas.

08	CN 108707641 A/China	Método de extração de peptídeos de colágeno de escamas de peixe	de Indústria de cosméticos, farmacêutica e de alimentos de	A invenção trata da obtenção de peptídeos de colágeno a partir da fermentação por bactérias ácido lácticas.	2018
09	CN 108822206 A	Um peptídeo de colágeno bioativo de pele de Bacalhau	-	A invenção trata da obtenção de peptídeo de colágeno de pele de bacalhau através do método de fermentação por bactérias mistas, ultrapressão, filtração e liofilização, para obter peptídeos de colágeno com atividade	2018

					antioxidante.		
10	CN 109022524 A/China	Processo de extração de peptídeo de colágeno de peixe pintado	de Industria de alimentos, de cosmético e nutracêuticos.	de	Nesta invenção o colágeno é hidrolisado por ação enzimática e pulverizado a jato sob baixa temperatura obtendo com isso peptídeos com atividade biológica.	2018	
11	CN 109136317 A/China	Um método para extração de peptídeos de colágeno	-	-	A invenção descreve um tipo de método para extração de peptídeo de colágeno de escama de peixe. A hidrolise enzimática ocorre por ação das enzimas na concentração 1-5%. As enzimas são: bromelina, pepsina e papaína. A aplicação deste método permite a obtenção de peptídeos de fácil absorção no intestino.	2019	
12	CN 109258916	Método de extração	de	Aplicação de reparação	na	A invenção descreve a	2019

	A/China	peptídeo de dentária e obtenção de colágeno de regeneração de peptídeos de escama de peixe da dentina de peptídeos de colágeno e seu uso			contendo cálcio.	
13	CN 109371092 A/China	Método de preparação de peptídeo de colágeno	de	-	A invenção descreve um método para obtenção de peptídeo de colágeno sob baixa temperatura por ação das enzimas lipase, tripsina e ficina.	2019
14	CN 109517868 B/China	Método de obtenção de peptídeo de colágeno derivado de peixe para retardar o envelhecimento	de	Indústria de alimentos, medicamentos e cosméticos.	Obtenção de peptídeos de colágeno utilizando álcool e enzimas.	2021
15	CN 110016076 A/China	Peptídeo de colágeno com atividade ECA obtido de pele de peixe	de	-	A inovação permite a obtenção de peptídeos de colágeno com ação de ECA, obtidos a partir da hidrólise por 2 enzimas. A sequência de aminoácidos de peptídeos de colágeno foi descrita como:	2019

16	CN 110643666 A/China	Peptídeo de - colágeno de escama de peixe e método de preparação do mesmo	Gly-Val-Gla.	A presente 2020 invenção adota método físico, na seguinte sequência: lavagem, aquecimento, adição de enzimas e quebra das escamas, facilitando a extração, devido a diminuição da superfície de contato entre a protease e o material.
17	CN 112062834	Peptídeo de - colágeno de pele de peixe de alto mar, extração e método de preparação	O método trata a 2021 obtenção de peptídeos de colágeno através da hidrólise por duas enzimas: papaína e tripsina, diminuindo o tempo do processo.	
18	CN 112608968 B/China	Método de - obtenção de peptídeos de colágeno de escamas de Tilápia	O método 2022 consiste na obtenção de peptídeos de colágeno em pó, facilitando a utilização do mesmo pela	

					indústria	
19	CN 113135992 A/China	Método de preparação de peptídeos de colágeno de escamas de peixe	-	A presente 2021	invenção trata da obtenção de peptídeos de colágeno usando o método de fermentação microbiana combinado a hidrólise enzimática, resultando na produção de peptídeos com alto grau de pureza e redução no custo de operação.	
20	CN 113151387 A/China	Método de obtenção de peptídeo de colágeno de pele de Bacalhau com função antioxidante e imunossupressora	-	O peptídeo de 2021	colágeno com atividade biológica é obtido a partir da hidrólise do colágeno de pele de Bacalhau por duas etapas, uma utilizando enzima sintética e a seguinte por tripsina.	
21	CN 113249423 A/China	Método de obtenção de peptídeo de colágeno de bacalhau em pó	-	Método de 2021	peptídeo de colágeno em pó obtido de pele de bacalhau e sua	

aplicação. A sequência de aminoácidos foi descrita: (Gly-X-Y)_n. O peptídeo foi obtido por hidrólise enzimática utilizando na enzima pepsina. Obtendo um biocomposto com baixo teor de cinzas, metais pesados, baixo peso molecular, sem cor e sem cheiro.

22	CN 113272321 A/China	Preparação e aplicação de produtos recombinantes de peptídeos de colágeno	-	A presente invenção trata da obtenção de um gel de peptídeo de colágeno para aplicação e formulações em diferentes indústrias.	2021
23	CN 113652459 A/China	Método de extração de peptídeo de colágeno de pele de Bacalhau	-	A obtenção do peptídeo de colágeno ocorre através da hidrólise enzimática utilizando a pepsina. A biomolécula	2021

obtida apresenta a sequência a seguinte sequência de aminoácidos (Gly-X-Y)_n, com baixo teor de cinzas e metais pesados, baixo peso molecular, sem cheiro, sem sabor e solúvel em água.

24	CN 113662924 A/China	Método de Indústria de preparação de um medicamentos nanocompósito fotossensibilizador de peptídeo de colágeno de peixe	O peptídeo de 2021 colágeno foi obtido a partir da combinação da protease com um fotossensibilizador hidrofóbico contendo carboxila. Este produto resultante é revestido por peptídeos, com tamanho variáveis e de fácil absorção. Podendo ser utilizados para obter imagens <i>in vivo</i> em terapias de tratamento de tumores.
25	CN 113698472	Preparação de peptídeos de	A invenção 2021 apresenta um

	A/China	colágeno de pele de peixe de alta pureza		método de obtenção de peptídeos de colágeno de pele de peixe por hidrólise enzimática usando uma protease alcalina. O gel resultante tem alto grau de pureza, baixo peso molecular, inodoro e incolor. A presente invenção divulga também um spray de peptídeos de colágeno.	
26	CN 113957111 A/China	Peptídeo de colágeno de pele de Bacalhau modificado pelo método fosforilado	-	O peptídeo de colágeno de pele de Bacalhau é obtido por meio enzimático, transformado em pó após a dessalinização e liofilização. O peptídeo de colágeno modificado é resultante da reação com ácido fosfórico.	2022
27	CN 114214384	Método de extração de	Industria de farmacêutica	Peptídeos de colágeno de pele	2022

		peptídeo de colágeno de origem marinha			de Bacalhau foram obtidos a partir da hidrólise enzimática, com alta atividade inibidora da ECA.	
28	CN 114605525 A	Método de - obtenção de peptídeo de colágeno de osso de Atum			Na presente 2022 invenção o peptídeo de colágeno é obtido utilizando as fases pré-tratamento, purificação da matéria-prima, repouso, hidrólise enzimática, filtração, concentração e secagem. Após a secagem, uma solução com n- hexano e solução de EDTA são utilizadas para obtenção de um produto com alto grau de pureza e com aplicação em escala industrial.	
29	CN 114773453 A/China	Método de - preparação de peptídeo de colágeno de alta resistência			O peptídeo de 2022 colágeno de osso e pele de peixe foi hidrolisado em um sistema digestivo biônico utilizando	

enzimas da saliva, suco gástrico e suco duodenal. Este processo permite a produção de peptídeos de colágeno de alta resistência gástrica.

30	CN 114807284 A/China	Método de obtenção de peptídeos de colágeno com alta pureza	-	Peptídeo de 2022 colágeno obtido de pele de peixe a partir da aplicação de método de hidrólise enzimática com alto grau de pureza. Para obter o nível de pureza após a hidrólise a solução foi separada por membrana e condensação de glucano.
31	KR 20200048610 A/Coréia	Método de aplicação de peptídeo de colágeno com alto teor de dipeptídeo	-	A presente 2020 invenção trata da obtenção de peptídeo de colágeno de peixe de baixo peso molecular com características importantes que

indicam que esses peptídeos podem ser úteis na redução de rugas, hidratação da pele, redução de manchas na pele e composição de cosméticos.

32	CN 110649666 A/China	Método de preparação de peptídeo de colágeno de escama de peixe	-	A presente 2020 invenção trata de um método físico para obtenção de peptídeo de colágeno de escama de peixe. O método físico auxilia na extração por aumentar a áreas de contato com as enzimas.	2020
33	CN 114605525 A/China	Método de preparação de peptídeo de colágeno de osso de Atum	-	A presente 2022 invenção trata da obtenção de peptídeo de colágeno de ossos de Atum com alto grau de pureza e baixo peso molecular para aplicação industrial.	2022
34	CN 109078164				2018

	A/China					
35	WO 2021/235767 A1/Coreia	Método para obtenção de peptídeo de colágeno de pele de Estrela do mar para aplicação em composição de cosmético	Indústria de cosméticos	de	A invenção trata da obtenção de peptídeos de colágeno com ação antioxidante prevenindo rugas na pele.	presente 2021
36	a 2018 00882	Procedimento para obtenção de peptídeo de colágeno antioxidante de pele de peixe de água doce	Indústria de cosméticos	de	A invenção se refere a obtenção de peptídeo de colágeno de pele de peixe de água doce com atividade antioxidante a partir da hidrólise por proteases colagenolíticas de origem bacteriana em uma raxão enzima substrato de 1:25 e 1:50 a 37-60°C por 6-24 horas.	2018

15. FUNÇÕES BIOLÓGICAS DOS PEPTÍDEOS OBTIDOS DE COLÁGENO RECUPERADO DE PEIXE

Os peptídeos de colágeno de peixe são de grande interesse para aplicação em diferentes áreas como indústria de cosméticos, alimentos e farmacêutica devido a abundância de suas fontes naturais e segurança durante os processos de obtenção. Nos últimos anos, vários estudos têm explorado as variadas atividades biológicas de peptídeos de resíduos de peixe, incluindo atividades antimicrobianas, antioxidantes, anti-hipertensivas, antidiabéticas e anticancerígenas.

a. ATIVIDADE ANTIMICROBIANA

Peptídeos antimicrobianos são um grupo de proteínas isoladas de quase todos os organismos vivos que apresentam atividade antimicrobiana em relação a uma ampla gama de infecções por microrganismos como as bactérias, vírus, fungos, protozoários e parasitas (SEMREEN et al., 2018). As classes de peptídeos antimicrobianos, como defensinas, catelicidinas, hepcidinas, histonas e piscidinas desempenham função protetora na pele dos peixes. São seguros por não induzirem toxicidade no hospedeiro e, graças a um amplo espectro de atividade antimicrobiana, são capazes para atingir vários patógenos (RAJUL et al., 2021). Além de apresentarem uma baixa especificidade na maioria dos casos, o risco de desenvolver resistência a eles também é muito baixo. Esses peptídeos são compostos não específicos pertencentes ao sistema imune inato com papel fundamental no mecanismo de defesa (AROCKIARAJ et al. 2015).

Esses compostos apresentam características específicas como composição de 12-45 aminoácidos com carga catiônica, tamanho, hidrofobicidade, flexibilidade e anfipaticidade; que servem como fatores importantes para interagir com a parede celular e/ou com a membrana plasmática de muitos microrganismos patogênicos (CHAUHAN; KANWAR, 2020). Até o momento, diversos estudos têm sido realizados sobre a ação desses peptídeos frente a bactérias Gram-positivas e Gram-negativas, destacando que ocorre a defesa do hospedeiro principalmente graças à formação de poros nas membranas bacterianas e suas subsequentes destruições.

No entanto, dependendo da fonte, método de obtenção, isolamento e purificação a atividade antimicrobiana dos peptídeos podem variar. Não obstante as fontes isoladas, muitos peptídeos são capazes de entrar ativamente na parede

celular para interação com o local alvo para combater microorganismos (VITALI, 2018) por meio da modulação do sistema imunológico por fagocitose, interferir na síntese de ácido nucleico e interromper a membrana do citoplasma (BARBOSA et al., 2020), sugerindo que os peptídeos podem ser usados como um agente antimicrobiano natural sozinho ou em combinação com antibióticos tradicionais. Barroso et al. (2021) analisaram as funções de beta-defensinas de robalo europeu (*Dicentrarchus labrax*), particularmente suas propriedades antimicrobianas e imunomodulatórias, a fim de desenvolver novos compostos profiláticos ou terapêuticos a serem usados na produção de aquicultura e ressaltaram a função antimicrobiana desse composto. Em revisão sistemática McMillan e Coombs (2021) relataram a função antimicrobiana (AMP) e anticâncer do peptídeo pleurocidina encontrado em solha-de-inverno (*Pseudopleuronectes americanus*), uma espécie de solha do atlântico. Há evidências promissoras para aplicações clínicas, na aquicultura e veterinária.

b. ATIVIDADE ANTIOXIDANTE

Os antioxidantes são compostos que possuem a capacidade de neutralizar os efeitos deletérios causados por radicais livres e espécies reativas de oxigênio (ROS) incluindo oxigênio singlete, peróxido de hidrogênio (H₂O₂), superóxido radicais ânion e hidroxila (CHI et al., 2015). Esses radicais livres, quando em concentrações não fisiológicas, podem danificar macromoléculas biológicas como proteínas e lipídios, levando ao desenvolvimento de muitas doenças. No entanto, as enzimas e/ou compostos antioxidantes inatos possuem a capacidade de eliminar ativamente as ROS e manter seus níveis fisiologicamente adequados no corpo humano (WU et al., 2015).

Peptídeos isolados de fontes marinhas ganharam um interesse significativo para sua aplicação como antioxidantes alternativos e a atividade antioxidante podem estar intimamente associado à sua composição de aminoácidos e sequência de peptídeo (WU et al., 2015). Os peptídeos antioxidantes desempenham um papel fundamental na prevenção da oxidação de componentes biológicos. Muitos peptídeos antioxidantes derivados de resíduos de peixe foram relatados como os extraídos de escamas de peixe corvina do pacífico (*Pseudosciaena polyactis*) (WANG et al., 2020); escamas de tilápia vermelha (*Oreochromis* sp.); pele de atum (*Thunnus*) (HAJFATHALIAN et al., 2018); pele de peixe polaca do Alasca (*Theragra*

chalcogramma) (HLEAP-ZAPATA; GUTIÉRREZ, 2017); e peixe anchova (*Engraulidae*) (ABUINE et al., 2019).

Os peptídeos com atividade antioxidante contêm aminoácidos com natureza hidrofóbica e com sequências mais curtas em comprimento, cerca de 5-16 aminoácidos, com valina e leucina no N terminal e prolina, tirosina e histidina presente na sequência da cadeia. A tirosina funciona como um fornecedor de elétrons através da cadeia lateral fenólica encontrada em sua estrutura, o que o torna eliminador de radicais e interrompem a reação contínua dos radicais (CHI et al., 2015).

Vários métodos são usados para avaliar a atividade antioxidante, e estes incluem a capacidade de absorção do radical de oxigênio (ORAC), poder antioxidante redutor de ferro (FRAP) e 2,2-difenil-1-picrilhidrazil (DPPH). Os peptídeos de baixo peso molecular MW têm valores de ORAC e atividades quelantes de metais pesado, enquanto os peptídeos de alto peso molecular MW têm FRAP mais alto e eliminação de radicais DPPH (JIN; AHN; JE, 2018; PAN et al., 2016). Zhang et al. (2019) produziram hidrolisados da pele de cavala espanhola (*Scomberomorous niphonius*) (F7) que demonstraram alto poder de redução e atividades radicais de limpeza em 2,2-Difenil-1-picrylhydrazyl (DPPH) (EC50 valor de 1,57 mg/mL) e hidroxyl (EC50 valor de 1,20 mg/mL). Indicando que esses peptídeos de colágeno de peles de cavala espanhola apresentam atividade antioxidante que permite várias aplicações industriais destes.

c. ATIVIDADE ANTICÂNCER

O câncer é hoje considerado a segunda principal causa de morte, e continua sendo uma das principais causas de morbidade em todo o mundo (ARNOLD et al., 2015). A doença é causada por anormalidade na proliferação de células normais, caracterizada pela perda no controle do crescimento celular normal com eventual pareamento de funções celulares regulares. O crescimento de células cancerosas pode ser controlado pela aplicação de compostos bioativos com um eficaz anticorpo relacionado a antígenos em células cancerosas (CHAUHAN; KANWAR, 2020).

Em revisão sobre o tema Hajfathalian et al. (2018) delinearão os potenciais efeitos anticancerígenos de peptídeos bioativos isolados de diferentes fontes, destacando o mecanismo de entrada dessas substâncias na bicamada lipídica da membrana celular, atraindo grande interesse para identificação de peptídeos bioativos de fontes naturais, como a de peixes, para sua aplicação potencial como um novo agente anticâncer. Estudo com pele de Truta-arco-íris (*Oncorhynchus*

mykiss) hidrolisada usando enzimas Alcalase (HA) e Flavourzyme (HF) e peptídeos bioativos separados pelo método de ultrafiltração de membrana (<3, 3–30 e > 30 kDa). As propriedades anticancerígenas das frações MTT e a linha celular HCT-116 foram analisadas. As frações isoladas nas células cancerosas HCT-116 apresentaram propriedades citotóxicas e inibiram o crescimento dessas células *in vitro* (YAGHOUBZADEH et al., 2020).

Anteriormente, Chi et al. (2015) hidrolisaram a pele de peixe porco-liso (*Aluterus monoceros*) usando colagenase em três temperaturas diferentes (5 °C, 25 °C e 50 °C) para obter peptídeos de colágeno. Frações de peptídeos de colágeno de baixo peso molecular (<3kDa) como CP-5, CP-25 e CP-50 foram obtidos por ultrafiltração sequencial com sistema de filtração de fluxo tangencial (TFF). Os resultados indicaram que o CP-5 exibiu máxima atividade anticâncer em relação às frações CP-25 e CP-50 *in vitro*. O ensaio para avaliar o efeito de citotoxicidade de peptídeos de colágeno em células cancerosas MTT, a fração CP-5 inibiu a viabilidade de células cancerosas COLO320 em até 49,78% em concentração de 1 mg/mL, enquanto a inibição foi de apenas 29,92% para fração CP-50, também *in vitro*. Indicando que após estudos *in vivo*, esses compostos tem viabilidade para aplicações biomédicas.

d. ATIVIDADE ANTIHIPERTENSIVA

A hipertensão é uma doença causada por um aumento da pressão arterial que pode resultar em doenças cardiovasculares, incluindo endocardite, doença cardíaca reumática e anormalidades baseadas no sistema de condução em proporções da epidemia. Essa doença está relacionada ao estilo de vida moderno, com 12,8% de casos de mortalidade relatados em todo o mundo (ABDELHEDI; NASRI, 2019). Para regular a hipertensão, o sistema hormonal renina angiotensina é estimulado para equilibrar a homeostase da pressão sanguínea e os fluidos corporais por meio da inibição da ECA (HAJFATHA et al., 2018). Conseqüentemente, os inibidores da ECA podem bloquear a conversão da angiotensina I em angiotensina II, uma vez que esta promove vasoconstrição resultando em contração da parede das artérias e pequenas arteríolas (ADMASSU et al., 2018).

Com isso, a indústria farmacêutica tem desenvolvido inibidores da ACE sintéticos, como captopril, lisinopril e enalapril para reduzir os efeitos da hipertensão, porém, como todo medicamento, existem efeitos colaterais que podem ser danosos para a saúde (KHOSITANON et al., 2021). Assim, é observado o interesse no

desenvolvimento de inibidores naturais da ECA para uso como suplemento alternativo para o tratamento de pacientes com pressão sanguínea elevada. Recentemente, Sungperma; Khonglab e Yongsawatdigula (2020) caracterizaram a pele de duas espécies de tilápia (TS) e pele de bagre híbrido (SH) para avaliar possível atividade inibitória da conversão de angiotensina (ACE) dos peptídeos de colágeno extraídos usando pepsina. O peptídeo de colágeno de pele de Bagre continha maiores quantidades de tyrosina (Tyr) e lisina (Lys).

Após fracionamento por membrana de ultrafiltração e identificação por cromatografia de exclusão, os peptídeos de colágeno de bagre apresentaram menor peso molecular (MW) <5 kDa e maior atividade inibitória ACE de 72,06% ($p < .05$). Este estudo revelou que peptídeos inibitórios de ACE derivados do colágeno de bagre poderiam ser desenvolvidos como um alimento funcional com propriedades antihipertensiva.

Shori, Yong, Baba (2020) visando obter um alimento funcional a base das ervas: Estrela-de-anis (*Illicium verum*), folhas sega de goiabeira (*Psidium guajava*), extrato aquoso de Curcuma; e de peptídeo de colágeno de peixe comercial para determinar seus efeitos na acidificação e na proteólise do leite por um período de 21 dias de armazenamento a 4 °C. Foi realizado teste da enzima conversora de angiotensina-I (ECA) para analisar a atividade inibitória de peptídeos bioativos produzidos durante a atividade proteolítica da enzima ECA. A maior atividade inibitória da ECA foi observada no 7º dia para os iogurtes adicionados de ervas e peptídeos de colágeno. Com isso, os autores ressaltaram que ervas e peptídeos de colágeno de peixe podem melhorar a fabricação e a formulação do iogurte com atividade anti-ACE.

e. ATIVIDADE ANTIDIABÉTICA

O diabetes é um distúrbio metabólico causado por níveis elevados de glicose no sangue. Nos últimos anos mais de 400 milhões de pessoas foram diagnosticadas com diabetes em todo o mundo e espera-se que aproximadamente 700 milhões de adultos podem ser diagnosticados com diabetes até 2045 (RIVERO PINO; ESPEJO-CARPIO; GUADIX, 2020). De acordo com a Federação Internacional de Diabetes (idf.org), essa doença pode ser classificada em dois tipos, diabetes tipo 1 e patologias do diabetes tipo 2, com diferentes etiologias. O diabetes tipo 1 é um distúrbio na qual o indivíduo dependente de insulina, caracterizado como doença autoimune mediada por células que provocam a destruição de células β pancreáticas

culminando na deficiência na secreção de insulina. No tipo 2, o distúrbio está relacionado à incapacidade de secreção de insulina e/ou resistência a insulina, sendo responsável por 90-95% do total de casos de diabetes (DALIRI et al., 2017).

A terapia atual para reduzir a resistência à insulina ou o aumento na concentração de glicose no sangue, no diabetes tipo 2, é medicamentosa (reduzindo a absorção da glicose da dieta ou aumentando a captação de glicose), no entanto, essas terapias têm efeitos colaterais indesejados. Portanto, é necessário desenvolver drogas antidiabéticas alternativas sem efeitos colaterais. Estudos recentes têm demonstrado a eficiência dos peptídeos de colágeno de peixe no alívio da síndrome associada ao diabetes (NASAB et al., 2020). Ayabe et al. (2015) produziram por digestão tripeptídeos a partir do músculo de peixe polaca do Alasca com efeitos de redução de glicose em camundongos KK-Ay, portador diabetes tipo II.

Recentemente, RitianJin et al. (2020) identificaram o peptídeo dipeptidil IV (DPP-IV) (inibidores da insulina) na pele de salmão do atlântico (*Salmo salar*), hidrolisados com pepsina, tripsina, papaína e alcalase, separadamente. O peptídeo hidrolisado por tripsina (10 mg/mL) apresentou a maior atividade inibitória de DPP-IV $66,12 \pm 0,68\%$, corroborando com os estudos sobre a função antidiabética dos peptídeos de colágeno.

16. PROPRIEDADES FUNCIONAIS DE PEPTÍDEOS DE COLÁGENO DE PEIXE

Propriedades funcionais são definidas como propriedades físico-químicas gerais de proteínas em sistemas alimentares durante o processamento, armazenamento e consumo. Alterações nas propriedades funcionais das proteínas nativas estão relacionadas a peptídeos e aminoácidos livres produzidos por hidrólise enzimática. A hidrólise enzimática controlada de proteínas produz uma série de polipeptídeos menores que modificam e até mesmo melhoram as características dos peptídeos tornando-os aptos para diferentes aplicações (GORGUÇ; GENDAG; YILMAZ, 2020).

A hidrólise enzimática é, portanto, um método que recupera componentes valiosos de peixes utilizando enzimas. Após a hidrólise os peptídeos apresentam características funcionais importantes como solubilidade em ampla gama de forças iônicas, diferentes níveis de pH, além de alta resistência ao calor. Além disso, contribui para o desenvolvimento de propriedades de retenção de água, textura e emulsificação quando adicionado a alimentos (AGYEI et al., 2016, LIU et al., 2016).

Estudos demonstram que peptídeos de colágeno apresentam capacidade de

retenção de água em algumas formulações de alimentos, além de uma boa capacidade de formar espuma, dando a eles a aplicabilidade como ingrediente emulsionantes e emulsificantes, podendo estabilizar uma variedade de produtos e auxiliar na formação e estabilização de produtos à base de espuma (SCHORODER et al., 2017; ASPEVIK; TOTLAND; LEA, 2016). Steinsholm et al. (2021) relataram as propriedades de emulsificante de peptídeos de colágeno extraídos de espinhas dorsais de salmão (*Salmo salar*) e bacalhau-do-atlântico (*Gadus morhua*).

A solubilidade é uma propriedade funcional dos peptídeos de colágeno de peixe que se destaca e está associada a outras propriedades como emulsificação, formação de espuma e capacidade de retenção de água, que são de total interesse para indústria de alimentos. Os peptídeos de colágeno de peixe são solúveis em uma ampla faixa de pH, o que os tornam úteis para aplicações na indústria de alimentos, como demonstrado nos estudos com diferentes biopeptídeos extraídos de espécies de peixes, a exemplo atum, polaca do Alasca e anchova (HAJFATHALIAN et al., 2018, HLEAP-ZAPATA; GUTIÉRREZ, 2017, ABUINE et al., 2019).

Zamorano-Apodaca et al. (2020) obtiveram cinco frações de peptídeos de colágeno de subprodutos (pele, cartilagem, aparas e ossos) de espécies de taíinha (*Mugil cephalus*), cação (*Selachimorpha*), peixe-guitarra (*Rhinobatidae*), pescada amarela (*Cynoscion regalis*), e peixe pargo (*Pagrus pagrus*). As frações F1, F2 e F3 apresentaram solubilidade $\geq 95\%$ no pH 7. A maior capacidade de espuma (78%), estabilidade de espuma (60%) e índice de estabilidade de emulsão (42 min) foram registradas na fração F1. No entanto, o maior índice de atividade emulsificante (130 m²/g) foi observado na fração F3. Demonstrando que os peptídeos de colágeno a partir de um subproduto misto de diferentes espécies de peixes pode ser uma alternativa com potencial biotecnológico para indústria.

A solubilidade dos peptídeos pode ser afetada por diferentes fatores, como a carga elétrica e o ponto isoelétrico; conforme o pH se afasta do ponto isoelétrico, a carga elétrica dos peptídeos aumenta e, assim, maiores solubilidades são alcançadas. Em alguns estudos os peptídeos de colágeno demonstraram aumentar a formação de espuma e emulsificação em comparação com proteínas nativas. As propriedades emulsificantes dos compostos hidrolisados enzimaticamente de peixes estão diretamente relacionados às propriedades da superfície; isto é, na medida em que o composto hidrolisado efetivamente reduz a tensão interfacial entre os compostos hidrofóbicos e hidrofílicos nos produtos alimentícios.

17. APLICAÇÕES TECNOLÓGICAS DOS PEPTÍDEOS DE COLÁGENO DE PEIXE SINTÉTICOS

As propriedades funcionais dos peptídeos de colágenos estão relacionadas ao peso molecular desses compostos, fonte, tipo de extração, e tipo de enzima utilizada durante a extração. Essas propriedades influenciam nas aplicações dos peptídeos nas diferentes indústrias, principalmente na indústria alimentos e nutracêutica.

a. INDÚSTRIA NUTRACÊUTICA

Nos últimos anos, a suplementação oral de peptídeos de colágeno tornou-se popular, pois tem sido cada vez mais comercializado no mercado como um produto antienvhecimento, pois a suplementação oral desses compostos atinge as camadas mais profundas da pele e melhora a fisiologia e aparência dos tecidos aumentando a hidratação, elasticidade, firmeza, redução de rugas e rejuvenescimento da pele (WANG et al., 2018; SIBILLA et al., 2015).

Alguns estudos relatam o potencial de aplicabilidade dos peptídeos de colágeno em alimentos funcionais e aplicações em produtos para os cuidados de saúde em forma de pílulas e bebidas (BILEK; BAYRAM, 2015; GUO et al., 2015 PAL; SURESH, 2016). Mirzapour-Kouhdasht et al. (2021) utilizaram os subprodutos (pele, escama e barbatanas) de peixe cavala (*Scomber scombrus*) para recuperar peptídeos de colágeno que apresentassem atividade antioxidante, após os estudos foi observado que esses compostos poderiam ser aplicados com segurança e precisão, como ingrediente para a fortificação de bebidas carbonadas. Da mesma forma, Krasnova; Semenov e Zarubin (2020) ao utilizarem peptídeos de colágeno recuperados de pele de bacalhau-do-Atlântico (*Gadus morhua*) como um componente de bebidas de frutas cítricas, observaram um aumento substancial no valor nutricional da bebida, assim como também uma melhora na viscosidade do produto.

PEPTÍDEOS SINTÉTICOS

Atualmente, a demanda por ingredientes alimentares para o desenvolvimento de alimentos saudáveis tem aumentado em decorrência da mudança no hábito de vida da população, com o decréscimo na ingestão e absorção de nutrientes, como as proteínas. Assim, a adição de peptídeos de colágeno em uma variedade de

alimentos e produtos de bebidas tem sido realizada.

No mercado global são encontrados peptídeos de colágeno sintéticos como GELITA Sol® DA, de diferentes fontes. Estudos tem sugerido a utilização de peptídeos de colágeno de origem de peixe para aplicação na produção de alimentos, como na confeitaria e sobremesas. Devido a sua ação anticoagulante, os peptídeos de colágeno podem reduzir os danos em células e tecidos originados por baixas temperaturas, portanto, pode ser útil em alimentos que requerem armazenamento em temperaturas frias ou congelantes. Esses compostos também podem ser utilizados na preparação de diversos produtos, como produtos cárneos, bebidas, sopas, entre outros, pois contribuem com a manutenção de suas propriedades sensoriais, químicas e físicas.

Peptídeos de colágeno aplicados em alguns alimentos.

Tabela 3. Peptídeos de colágeno de peixe comerciais

Marca	Aplicação	Continente/País
Gelita AG	Alimentos, nutraceuticos, farmacêuticos	África, Ásia, Europa, América Central e América do Sul
ELASTEN®	Produtos dermatológicos	Alemanha
COBIOSA	Produtos dermatológicos e funcionais	Espanha
Weishardt	Produtos alimentícios e nutraceuticos	França
Rousselot	Farmacológicos e nutraceuticos	Bélgica
KENNEY & ROSS LIMITED MARINE GELATIN,	Farmacêutica e nutraceuticas	América do Norte, Ásia e Europa
ConnOils L.L.C.	Produtos alimentícios e nutracêuticos	Estados Unidos
LAPI GELATINE S.p.a.	Produtos alimentícios	Itália

Ewald-Gelatine GmbH	Produtos alimentícios	Alemanha
ET-Chem.	Suplemento alimentar, alimentos e bebidas, farmacêuticos e cosméticos	Europa, Estados Unidos, Brasil e Índia
ITALGELATINE S.p.A	Indústria de alimentos	Itália, Japão e Polônia
JUNCÀ GELATINES SL,	Suplemento alimentar, alimentos e bebidas, farmacêuticos, nutracêuticos, cosméticos e ração	Espanha
HolistaColltech.	Produtos alimentícios, cosméticos e nutracêuticos	América do Norte e Ásia
PB Leiner	Produtos alimentícios	Brasil
Collagen Solutions Plc	Biomaterial em seguimentos médicos	Reino Unido
Nippi Collagen NA Inc.	Suplemento alimentar, farmacêuticos, nutracêuticos, cosméticos	América do Norte
Vital Proteins L.L.C.	Nutracêuticos	Brasil

CONCLUSÃO

Esta revisão demonstra que os subprodutos de peixe são potenciais fonte segura de biocompostos, como os peptídeos bioativos. Esta revisão também examina a literatura atual para a obtenção e purificação de peptídeo de colágeno. As várias atividades biológicas de peptídeos de colágeno também são resumidas, o que inclui atividade antioxidante e atividade antimicrobiana. Assim, com base nessas atividades biológicas são apontadas algumas aplicações biotecnológicas, como a farmacológica, cosmética e alimentícia. Atualmente, as pesquisas ainda estão em fase experimental e há uma necessidade de investigações mais aprofundada para a segurança da aplicação de biocompostos a longo prazo.

REFERENCIA BIBLIOGRAFICA

ABUINE, R., RATHNAYAKE, A.U., BYUN, HG. Biological activity of peptides purified from fish skin hydrolysates. *Fish Aquatic Sci*, v.22, n.10, 2019.

ACQUAH, C.; CHAN, Y.W.; PAN, S.; AGYEI, D.; UDENIGWE, C.C. Structure-informed separation of bioactive peptides. *J Food Biochem*. 2019;43:e12765.

ALVARES, T.S., CONTE-JUNIOR, C.A., PIERUCCI, A.P., OLIVEIRA, G.V., CORDEIRO, E.M. Acute effect of fish protein hydrolysate supplementation on vascular function in healthy individuals. *Journal of Functional Foods*, v.46, p.250–255, 2018.

AGYEI, D., ACQUAH, C., TAN, K. X., HIL, H.K., RAJENDRAN, S.R.C. K., UDENIGWE, C.C., DANQUAH, M.K. Prospects in the use of aptamers for characterizing the structure and stability of bioactive proteins and peptides in food. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, v.410, n.2, p.297–306, 2017.

AGYEI, D., BAMBARANDAGE, E., UDENIGWE, C.C. The role of bio-informatics in the discovery of bioactive peptides. In: L. Melton, F. Shahidi, & P. Varelis (Eds.), *Reference module in food science* (pp. 337–344). Cambridge: Elsevier, ISBN 9780128140451, 2016.

AHMED, T.A.E., HAMMAMI, R. Recent insights into structure-function relationships of antimicrobial peptides. *Journal of Food Biochemistry*, 2018.

ALUKO, R.E. Food protein-derived peptides: Production, isolation, and purification. In *Proteins in food processing*. Elsevier, 2018.

AYATI, S.; EUN, J-B.; ATOUB, N.; MIRZAPOUR-KOUHDASHT, A. Functional yogurt fortified with fish collagen-derived bioactive peptides: Antioxidant capacity, ACE and DPP-IV inhibitory. Functional yogurt fortified with fish collagen-derived bioactive peptides: Antioxidant capacity, ACE and DPP-IV inhibitory *Journal food processing and preservation*. N.1, 2022.

CHOI, D., MIN, S-G., JO, Y-J. Functionality of porcine skin hydrolysates produced by hydrothermal processing for liposomal delivery system. *J Food Biochem.* v.42, p.12464, 2018.

CHEUNG, R.C.F.; NG, T.B.; WONG Marine Peptides: Bioactivities and Applications. *Mar. Drugs* 2015, 13, 4006-4043.

CHOKSAWANGKAM, W., PHIPHATTANANUKOON, S., JARESITTHIKUNCHAI, J., ROYTRAKUL, S., RESOURCES, N. Antioxidative peptides from fish sauce by-product: Isolation and characterization. *Agriculture and Natural Resources*, v.5, p.460–466, 2018.

DALIRI, E.B-M.; LEE, B.H.; OH, D. (2018) Current trends and perspectives of bioactive peptides, *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 58:13, 2273-2284.

DAS, A., NAYAK, Y., DASH, S. Biochemical extraction and characterization of protein hidrolysate and trypsin from viscera of labeo rohita. *International Journal of Zoology and Applied Biosciences*, v.6, p.46-56, 2021.

ENNAAS, N., HAMMAMI, R., GOMAA, A., BEDARD, F., BIRON, E., SUBIRADE, M., et al. Collagencin, an antibacterial peptide from fish collagen: Activity, structure and interaction dynamics with membrane. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, v.473, n.2, p.642–647, 2016.

GAO, R., SHEN, Y., SHU, W., JIN, W., BAI, F., WANG, J., et al. Sturgeon hydrolysates alleviate DSS-induced colon colitis in mice by modulating NF- κ B, MAPK, and microbiota composition. *Food & Function*, v.11, n.8, p.6987–6999, 2020.

GUO, L., HARNEDY, P.A., O'KEEFFE, M.B., ZHANG, L., Li, B., HOU, H., FITZGERALD, R.J. Fractionation and identification of Alaska pollock skin collagen-derived mineral chelating peptides. *Food Chemistry*, v.173, p.536–542, 2015.

HARIKRISHNA, N., MAHALAKSHMI, S., KUMAR, K.K., REDDY, G. Fish scales as potential substrate for production of alkaline protease and amino acid-rich aqua hydrolyzate by *Bacillus altitudinis* GVC11. *Indian J Microbiol*, v.57, n.3, p.339-343, 2017.

LAPI, I.; KOLLINIATI, O.; ASPEVIK, T.; DEIKTAKIS, A.E.; AXARLIS, K.; DASKALAKI, M.G.; DERMITZAK, E.; TZARDI, M.; KAMPANIS, S.C.; MARSNI, Z.E.; KOUSOULAKI, K.C.; TSATSANIS, C.; VENIHAKI, M. Collagen-Containing Fish Sidestream-Derived Protein Hydrolysates Support Skin Repair via Chemokine Induction. *Mar. Drugs* 2021, 19(7), 396; <https://doi.org/10.3390/md19070396>

LEE, S.H.; PARK, H.K.; LEE, H.J.; JO, H.R.; LEE, E.-J.; HWANG, S.-H.; CHUNG, H.-C.; LEE, J.-H.; KIM, D.-U.; LEE, J.; MOON, T.K. Oral Supplementation with Low-molecular-weight Collagen Peptide Improves Hydration, Facial Lifting, Dermal Density, Skin Desquamation and Nails: A Randomized, Double-blind, Placebo-controlled, and Maintenance of Effect Study. *Journal of Food and Nutrition Research*, 2022, Vol. 10, No. 8, 546-559.

RAW264.7 macrophages via the MAPK pathway. *Journal of Functional Foods*, v.72, p.104044, 2020.

TIAN, Q.; LI, S.M.; LI, B. The Pro-Gly or Hyp-Gly Containing Peptides from Absorbates of Fish Skin Collagen Hydrolysates Inhibit Platelet Aggregation and Target P2Y12 Receptor by Molecular Docking. *Foods* 2021, 10(7), 1553; <https://doi.org/10.3390/foods10071553>

GAO, R., SHU, W., SHEN, Y., SUN, Q., JIN, W., LI, D., et al. Peptide fraction from Sturgeon muscle by pepsin hydrolysis exerts anti-inflammatory effects in LPS-stimulated RAW264.7 macrophages via MAPK and NF- κ B pathways. *Food Science and Human Wellness*, 2020.

HAJFATHALIAN, M.; GHELICHI, S.; GARCÍA-MORENO, P.J.; SORENSEN, A.-D.M.; JACOBSEN, C. Production, bioactivity, functionality, and applications, *Critical Reviews. Food Science and Nutrition*, v.58, n.18, p3097-3129, 2018.

ISHAK, N.H., SARBON, N.M. A review of protein hydrolysates and bioactive peptides deriving from wastes generated by fish processing. *Food and Bioprocess Technology*, v.11, n.1, p.2–16, 2018.

LEE, E.J.; HUR, J.; HAM, S.A.; JO, Y.; LEE, S.; CHOI, M. J., et al. Fish collagen peptide inhibits the adipogenic differentiation of preadipocytes and ameliorates obesity in high fat diet-fed mice. *International Journal of Biological Macromolecules*, v.104, p.281–286, 2017.

LUO, J.; ZHOU, Z.; YAO, X.; FU, Y. Mineral-chelating peptides derived from fish collagen: Preparation, bioactivity and bioavailability. *LWT Volume 134*, December 2020, 110209

MAHBOOB, S. Isolation and characterization of collagen from fish waste material-skin, scales and fins of *Catla catla* and *Cirrhinus mrigala*. *J Food Sci Technol*, v.52, n.7, p.4296–4305, 2015.

NGO, D. H., KANG, K. H., RYU, B., VO, T.S., JUNG, W. K., BYUN, H. G., et al. Angiotensin-I converting enzyme inhibitory peptides from antihypertensive skate (*Okamejei kenojei*) skin gelatin hydrolysate in spontaneously hypertensive rats. *Food Chemistry*, v.174, p.37–43, 2015.

NGO, D-H, VO, T-S, RYU, B.M., KIM, R. S-K. Angiotensin- I- converting enzyme (ACE) inhibitory peptides from Pacific cod skin gelatin using ultrafiltration membranes *Process Biochemistry*, v.51, p.1622-1628, 2016.

RAVESCHOT, C., CUDENNEC, B., COUTTE, F., FLAHAUT, C., FREMONST, M., DRIDER, D., et al. Production of bioactive peptides by lactobacillus species: From gene to application. *Frontiers in Microbiology*, v.9, n.2354, 2018.

SEMREEN, M.H.; EL-AWADY, F.; WALEED, D.; SAUDI, K.L. Recent updates of marine antimicrobial peptides. *Pharmaceutical Journal*, v.26, p.396-409, 2018.

SANCHES, A.; BLANCO, M.; CORREA, B.; PEREZ-MARTIN, R.I.; SOTELO, C.G. Effect of Fish Collagen Hydrolysates on Type I Collagen mRNA Levels of Human Dermal Fibroblast Culture. *Mar. Drugs* 2018, 16(5), 144;

SIERRA, L., FAN, H., ZAPATA, J., WU, J. Antioxidant peptides derived from hydrolysates of red tilapia (*Oreochromis sp.*) scale. *LWT*, v.,146, p.111631, 2021.

SUN, X., WANG, K., GAO, S. et al. Purification and characterization of antioxidant

peptides from yak (*Bos grunniens*) bone hydrolysates and evaluation of cellular antioxidant activity. *J Food Sci Technol*, v.58, p.3106–3119, 2021.

WU, C-H.; GUO, H-R.; PATEL, A.K.; SINGHANIA, R.R.; CHEN, Y-A.; KUO, J-M.; DONG, C-D. Production and characterization of lucrative hypoglycemic collagen-peptide-chromium from tilapia scale. *Process Biochemistry* Volume 115, April 2022, Pages 10-18.

WANG, W.-Y.; ZHAO, Y.-Q.; ZHAO, G.-X.; CHI, C.-F.; WANG, B. Antioxidant Peptides from Collagen Hydrolysate of Redlip Croaker (*Pseudosciaena polyactis*) Scales: Preparation, Characterization, and Cytoprotective Effects on H₂O₂-Damaged HepG2 Cells. *Mar. Drugs*, v. 18, n.156, 2020.

WANG, L., JIANG, Y., WANG, X., ZHOU, J., CUI, H., XU, W., et al. Effect of oral administration of collagen hydrolysates from Nile tilapia on the chronologically aged skin. *Journal of Functional Foods*, v.44, p.112–117, 2018.

WANG, G., SU, J., LI, L., FENG, J., SHI, L., HE, W., et al. Edaravone alleviates hypoxia-acidosis/reoxygenation-induced neuronal injury by activating ERK1/2. *Neuroscience Letters*, v.543, p.72–77, 2015.

WANG, L., SUN, J., DING, S., QI, B. Isolation and identification of novel antioxidant and antimicrobial oligopeptides from enzymatically hydrolyzed anchovy fish meal. *Process Biochemistry*, v.74, p.148–155, 2018.

XIAO, M., DING, L., YANG, W., CHAI, L., SUN, Y., YANG, X., et al. St20, a new venomous animal derived natural peptide with immunosuppressive and antiinflammatory activities. *Toxicon*, v.127, p.37–43, 2017.

WANGTUEAI, S., SIEBENHANDI-EHN, S.; HALTRICH, D. Optimization of the Preparation of Gelatin Hydrolysates with Antioxidative Activity from Lizardfish (*Saurida* spp.) Scales Gelatin.. *Chiang Mai J. Sci.*, v.43, n.1, p.68-79, 2016.

ZHANG, W.; ZHENG, J.; TIAN, X.; TANG, Y.; DING, G.; YANG, Z.; JIN, H. Pepsin-Soluble Collagen from the Skin of *Lophius litulo*: A Preliminary Study Evaluating Physicochemical, Antioxidant, and Wound Healing Properties. *Mar. Drugs* 2019, 17(12), 708.

7 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Subprodutos de pescado são fontes ricas de macromoléculas destacando-se as proteases colagenolíticas. Esses compostos que podem ser semipurificados utilizando métodos de baixo custo e sem danos ao meio ambiente como o método de particionamento de enzimas utilizando sistema de duas fases, confirmado no presente estudo. O método de particionamento pode ser aplicado em escala laboratorial para recuperação de colagenases, sendo um importante recurso para indústria pesqueira, como visto no presente estudo com vísceras de Taíña.

No segundo capítulo deste trabalho foi tratado a recuperação de macromoléculas, como os biopeptídeos de colágeno, de subprodutos de peixe numa revisão integrativa. Nesta etapa foram abordados os métodos de obtenção de biopeptídeos por hidrólise do colágeno utilizando meio enzimático e ácido; assim como também suas propriedades biológicas e funcionais. Assim foi esclarecido que a recuperação, purificação e identificação desses compostos biológicos é de grande interesse para indústria de processamento de pescado, pois resolveria o problema do descarte incorreto destes, contribuindo para o equilíbrio do ecossistema terrestre e marinho.