



INSTITUTO DE TECNOLOGIA DE ALIMENTOS

Centro de Ciência e Qualidade dos Alimentos

ANA LAÍS ANDRADE GASPARDI

**ATIVIDADE HIPOGLICEMIANTE E ANTIOXIDANTE DE PEPTÍDEOS DE
COLÁGENO HIDROLISADO DE DIFERENTES ESPÉCIES**

CAMPINAS

2021

ANA LAÍS ANDRADE GASPARDI

**ATIVIDADE HIPOGLICEMIANTE E ANTIOXIDANTE DE PEPTÍDEOS DE
COLÁGENO HIDROLISADO DE DIFERENTES ESPÉCIES**

*Dissertação apresentada ao Instituto de
Tecnologia de Alimentos para obtenção do
título de Mestre em Ciência e Tecnologia de
Alimentos.*

Aluno: Ana Laís Andrade Gaspardi

Orientador: Maria Teresa Bertoldo Pacheco

Este exemplar corresponde à versão final da Dissertação defendida pelo aluna, Ana Laís Andrade Gaspardi, e orientada pelo Profa. Dra. Maria Teresa Bertoldo Pacheco.

CAMPINAS

2021

Agência(s): Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo

Nº do proc.: O presente trabalho foi realizado com apoio da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo pelo projeto PDIP (2017/50349-0) e pela bolsa (2019/11200-7).

Ficha Catalográfica

Elaborada pela Bibliotecária Lucilene Paulina da Silva CRB/8 - 8507
Biblioteca Central do Instituto de Tecnologia de Alimentos (Ital)

G249a Gaspardi, Ana Laís Andrade.

Atividade hipoglicemiante e antioxidante de peptídeos de colágeno hidrolisado de diferentes espécies. Ana Laís Andrade Gaspardi / Dissertação de Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos. Campinas, SP: ITAL – Instituto de Tecnologia de Alimentos, 2021.

88 f.

Orientação: Profa. Dra. Maria Teresa Bertoldo Pacheco.

1. Atividade antioxidante. 2. Atividade hipoglicemiante. 3. Proteção ao DNA. 4. Peptídeos bioativos. I. Instituto de Tecnologia de Alimentos (Ital). Centro de Ciência e Qualidade de Alimentos (CCQA). II. Gaspardi, Ana Laís Andrade. III. Título.

Título em inglês: Hypoglycemiating and Antioxidant activity of hydrolyzed collagen peptides from different species

Key-words: Antioxidant activity; Hypoglycemic activity; DNA protection; Bioactive Peptides.

Titulação: Mestre em Ciência e Tecnologia de Alimentos

Banca Examinadora: Maria Teresa Bertoldo Pacheco, Fabiana Andrea Barrera Galland e Maria Elisa Caetano Silva Abreu

Data da Defesa: 25/10/2021

Programa de Pós-graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos

BANCA EXAMINADORA

Este exemplar corresponde à redação final da Dissertação de Mestrado defendida por Ana Laís Andrade Gaspardi, aprovada pela Comissão Julgadora em 25/10/2021.

Prof.(a) Dr.(a) Maria Teresa Bertoldo Pacheco
CCQA/ ITAL - (Presidente)

Dr.(a) Fabiana Andrea Barrera Galland
CCQA/ITAL - (Titular)

Dr.(a) Maria Elisa Caetano Silva Abreu
Department of Animal Sciences/University of Illinois at
Urbana, Champaign- (Titular)

A ata de defesa de dissertação de mestrado com as respectivas assinaturas dos membros da banca encontra-se arquivada junto à documentação do aluno.

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho ao meu avô, Irineu Alves de Andrade (*In Memoriam*) que foi exemplo de um homem de bem.

AGRADECIMENTOS

À Deus, pela vida e pela força para enfrentar todas as dificuldades nesses dois anos de mestrado, além disso pela oportunidade em conhecer o ITAL e minha equipe.

Agradeço à minha família pelo apoio e incentivo pela realização do meu sonho em fazer o mestrado.

À Profa. Dra. Maria Teresa Bertoldo Pacheco, pela oportunidade da realização deste trabalho e excelente orientação. Obrigada por todo apoio, carinho, confiança, paciência, compreensão, pelas conversas pessoais e pelos conhecimentos compartilhados.

À agência Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), pela bolsa concedida e a diretora geral do ITAL, Eloísa Garcia que foi a responsável pela minha bolsa Fapesp e que sempre estava disposta a ajudar sobre a prorrogação da minha bolsa durante o mestrado devido ao atraso pela pandemia.

Ao Programa de Pós-graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, a todos os professores que o compõem, por todo apoio e dedicação.

Agradeço também aos profissionais do Instituto de Tecnologia de Alimentos (ITAL), Vera, Rosana, Danielle, Mariana Bisinotto, Mariana Pacífico, Fabiana e Elisa, com os quais tive a oportunidade de trabalhar no Centro de Qualidade e Ciência de Alimentos do Laboratório de Química (CCQA-LQ), que colaboraram comigo durante a rotina de laboratório, com paciência, disponibilidade, alegria e empatia. Em especial Fabiana, que no final do trabalho compartilhou muito de seus conhecimentos para que eu conseguisse realizar as análises hipoglicemiantes.

Agradeço também à Dra. Rosângela Maria Neves Bezerra e aos integrantes do Laboratório Multidisciplinar em Alimentos e Saúde (LABMAS), Luis Gustavo Saboia e Fernando Simabuco pela parceria fundamental na realização de análises antioxidantes.

Às minhas amigas de mestrado, Aline, Fernanda, Vanessa e Heidi que deram todo apoio nos momentos mais difíceis, sempre com positividade e desejando sempre o melhor para mim, ficará para sempre o nosso grupo “Meninas do Ital”.

Aos meus amigos, especialmente Ângela que me incentivava todos os dias para lutar e finalizar as minhas análises. Obrigada pelo seu apoio.

À minha querida amiga, Sônia, que foi uma pessoa primordial para que eu realizasse esse sonho. Obrigada pela sua paciência, carinho e total apoio nos momentos mais difíceis.

RESUMO

Peptídeos obtidos de hidrolisados proteicos têm recebido especial atenção da área científica pela capacidade de modularem algumas atividades biológicas, destacando-se os peptídeos provenientes de hidrolisado do colágeno. Estudos relataram que os peptídeos resultantes da quebra do colágeno, oriundo de fontes diversas, podem apresentar propriedades antioxidante, anti-hipertensiva, antitrombótica, anti-ulcerativa, cicatrizantes e efeitos osteoprotetores. O objetivo deste trabalho foi caracterizar e avaliar o potencial biológico de colágenos comerciais provenientes de diferentes matrizes bovino (HB), pescado (HP) e suíno (HS), em relação às atividades antioxidante e hipoglicemiante. Todas as amostras apresentaram porcentagem superior a 90% para o teor de proteína, além disso apresentaram em média 7% de umidade, $\leq 1\%$ de cinzas e elevado teor dos aminoácidos Gly, Pro e Hyp, responsáveis pela estrutura específica do colágeno. A presença do aminoácido livre tirosina (Tyr) foi superior no PH, podendo ser responsável pelo potencial antioxidante. Com relação ao grau de hidrólise (GH) foi observado que a amostra BH apresentou maior GH (8,7%), o que corrobora com a maior porcentagem de peptídeos menores do que 2 kDa (74,1%). Todos os colágenos analisados apresentaram inibição das enzimas gastrointestinais (α -amilase e α -glicosidase) pelo estudo *in vitro*, assim pode-se concluir que apresentam potencial para prevenir a doença diabetes Mellitus, sendo resultado inédito na literatura. Das técnicas utilizadas para as atividades antioxidantes, ORAC e sequestro do radical ABTS foi mais expressivo o PH que apresentou 67,08 e 65,69 ($\mu\text{mol Trolox Eq./g}$), respectivamente. A análise de proteção ao DNA pela primeira vez foi analisada para os peptídeos de colágeno hidrolisado, sendo que FH apresentou ação antioxidante protetora ao DNA- *supercoiled* tanto na presença (39,51%) como na ausência do AAPH (reagente oxidante dicloreto de 2,2'-azobis(2-amidinopropano)), sendo a proteção de 96,36%. Os resultados confirmaram que a fonte do colágeno nativo pode influenciar nas funcionalidade bioativa dos peptídeos de colágenos hidrolisados, provavelmente devido a sua composição e sequência aminoacídica.

Palavras-chave: Atividade antioxidante; Atividade hipoglicemiante; Proteção ao DNA; Peptídeos bioativos

ABSTRACT

Peptides searched for protein hydrolysates receive special attention from the scientific area due to their ability to modulate some biological activities, especially those derived from collagen hydrolysates. Studies have reported that peptides respond by breaking down collagen, coming from different sources, and may have antioxidant, anti-hypertensive, anti-thrombotic, anti-ulcerative, healing and osteoprotective effects. The objective of this work was to characterize and evaluate the biological potential of commercial collagens from different bovine (BH), fish (FH) and swine (PH) matrices, in relation to their antioxidant and hypoglycemic activities. All dissipation rates greater than 90% for protein content, furthermore dissipated on average 7% moisture, $\leq 1\%$ moisture and high content of the amino acids Gly, Pro and Hyp, responsible for the specific structure of collagen. The presence of the free amino acid tyrosine (Tyr) was higher in PH and may be responsible for the antioxidant potential. Regarding the degree of hydrolysis (GH), it was observed that the BH sample had higher GH (8.7%), which corroborates the higher percentage of peptides smaller than 2 kDa (74.1%). All collagens dissipate inhibition of gastrointestinal enzymes (α -amylase and α -glucosidase) by in vitro study, thus it can be concluded that they have potential to prevent diabetes mellitus disease, being an unprecedented result in the literature. Of the techniques used for antioxidant activities, ORAC and ABTS radical scavenging, the pH was more expressive, which presented 67.08 and 65.69 ($\mu\text{mol Trolox Eq./g}$), respectively. The DNA protection analysis for the first time was analyzed for hydrolyzed collagen peptides, and FH showed a protective antioxidant action to supercoiled DNA both in the presence (39.51%) and in the presence of AAPH (oxidizing reagent dichloride of 2, 2'-azobis (2-amidinopropane), sending 96.36% protection. The results confirmed that the native collagen source can influence the bioactive functionality of hydrolyzed collagen peptides, probably due to its composition and amino acid sequence.

Key words: Antioxidant activity; Hypoglycemic activity; DNA protection; Bioactive Peptides

SUMÁRIO

RESUMO.....	vii
ABSTRACT	viii
SUMÁRIO.....	ix
INTRODUÇÃO	15
OBJETIVOS	17
Objetivo principal.....	17
Objetivos específicos	17
CAPÍTULO 1.....	18
REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	18
1. Proteína de colágeno.....	18
2. Estrutura e Síntese de Colágeno no Organismo Humano.....	19
3. Composição Aminoacídica do Colágeno.....	23
4. Colágeno Hidrolisado e suas Fontes.....	24
5. Peptídeos Bioativos.....	27
5.1. Peptídeos Bioativos de Origem Animal.....	29
6. Estresse Oxidativo e Antioxidantes.....	31
7. Diabetes Mellitus e Enzimas Gastrointestinais.....	39
8. Mecanismo de Inibição das enzimas α -amilase e α -glicosidase.....	42
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	44
CAPÍTULO 2.....	59
Artigo para submissão	60

INTRODUÇÃO

O mundo passou a envelhecer mais nos últimos anos, uma vez que países desenvolvidos e em desenvolvimento passaram a ter redução da taxa de mortalidade e fecundidade, acompanhado do aumento da expectativa de vida da população. Segundo a Organização Mundial de Saúde, idoso é todo indivíduo com 60 anos ou mais, até 2050 a população mundial idosa deverá totalizar 2 bilhões (OMS, 2018). Com o aumento da longevidade, as doenças crônicas associadas ao envelhecimento também aumentaram, bem como os custos hospitalares com esta população (OMS, 2005). À medida que o organismo envelhece, muitos processos no mesmo alteram-se, como na redução da absorção de nutrientes e o metabolismo torna-se mais lento (SGARBIERI *et al.*, 2020). Uma das consequências do envelhecimento é a degradação ou redução do colágeno pelo organismo. O colágeno é a principal proteína do tecido conjuntivo com função na integridade estrutural e adesão à matriz extracelular. Nas últimas décadas, o colágeno hidrolisado ganhou espaço no mercado devido a suas inúmeras aplicações, principalmente na área estética e cosmética devido às suas atividades reparadoras dos tecidos cutâneos. Além disso, é um subproduto de matadouros e frigoríficos encontrado em ossos, pele, couro ou tecidos de animais, fato esse que auxilia na sustentabilidade com o aproveitamento desses resíduos. Estudos apontam que a ingestão de peptídeos de colágeno hidrolisado pode favorecer a regeneração e recuperação de lesões, aumento da densidade óssea combatendo doenças relacionadas ao envelhecimento como tendinite, bursite, osteoporose, osteoartrite e distensão muscular (PORFÍRIO e FANARO, 2016; BELLO e OESSER, 2006; MOSKOWITZ, 2000).

No que diz respeito a complicações provenientes do envelhecimento, tais como estresse oxidativo, dano ao DNA e condição hiperglicêmica, observado em doenças crônicas tais como a Diabetes mellitus tipo II (DM 2), as propriedades bioativas dos peptídeos de colágeno ainda são pouco exploradas. Tem sido apontado que um dos mecanismos que podem auxiliar no tratamento de DM 2 é a prevenção do estresse oxidativo, através do combate as espécies reativas ao oxigênio (EROS), onde podem entrar em ação os peptídeos antioxidantes, bem como sua capacidade de inibir importantes enzimas do metabolismo da glicose. A

atividade de alguns peptídeos em inibir a α -amilase e α -glicosidase, por um mecanismo alostérico, pode reduzir a taxa de absorção de monossacarídeos impedindo o aumento da glicemia pós-prandial (PERFETTI *et al.*, 1998).

Peptídeos são definidos como fragmentos que se encontram inativos ou criptografados na proteína nativa, os quais ao serem liberados através da ação hidrolítica da proteína, podem exercer diferentes bioatividade benéficas à saúde humana, agindo como antioxidantes e antidiabéticos (SGARBIERI *et al.*, 2020; CHAKRABARTI *et al.*, 2018). Diferentes fontes de alimentos e colágeno podem gerar peptídeos com bioatividade diversificada. Contudo, ao nosso conhecimento para os peptídeos de colágeno estas bioatividades não estão totalmente evidenciadas. Este trabalho incluiu a caracterização e determinação do potencial antioxidante e hipoglicemiante de amostras comerciais de hidrolisados do colágeno de diferentes fontes animais, tais como de bovino, pescado e suíno.

REFERÊNCIAS

BELLO, A. E.; OESSER, S. Collagen hydrolysate for the treatment of osteoarthritis and other joint disorders: A review of the literature. **Curr. Med. Res. Opin.**, v. 22, p. 2221–2232, 2006.

CHAKRABARTI, S., GUHA, S., & MAJUMDER, K. Peptídeos bioativos derivados de alimentos na saúde humana: desafios e oportunidades. **Nutrientes**, v. 10, n. 11, p.1738, 2018.

GÓMEZ-GUILLÉN, M.C.; GIMÉNEZ, B.; LÓPEZ-CABALLERO, M.E.; MONTERO, M.P. Functional and bioactive properties of collagen and gelatin from alternative sources: A review. **Food Hydrocoll**, v. 25, n. 8, p. 1813-27, 2011.

IBGE, Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. **Idosos indicam caminhos para uma melhor idade**, 2019. Disponível <Idosos indicam caminhos para uma melhor idade | Agência de Notícias | IBGE> Acesso em: 19/09/2021.

MACHADO, A.; LIRIA, C. W.; PROTI, P. B.; REMUZGO, C.; MIRANDA, M. T. M. Síntese Química e enzimática de peptídeos: Princípios básicos e aplicações. **Quim. Nova.**, v.27, n.5, p.781-785, 2004.

MOSKOWITZ, R. W. Role of collagen hydrolysate in bone and joint disease. **Seminars in Arthritis and Rheumatism**, v.30, p. 87-99, 2000.

OMS, Organização Mundial da Saúde. **Ageing and health**, 2018. Disponível < Ageing and health (who.int)>. Acesso em: 19/09/2021.

PERFETTI, R.; BARNETT, P. S.; MATHUR R.; EGAN, J. M. Novel therapeutic strategies for the treatment of type 2 diabetes. **Diabetes Metabol Res**, v. 14, n. 3, p. 207-225, 1998.

PORFÍRIO, E.; FANARO, G. B. Suplementação com colágeno como terapia complementar na prevenção e tratamento de osteoporose e osteoartrite: uma revisão sistemática. **Rev.Bras. Geriatr.Gerontol.**; v. 19, n. 1. p. 153-164, 2016.

PRESTES, R. C. Colágeno e seus derivados: características e aplicações em produtos cárneos. Universidade Federal de Santa Maria, Departamento de Tecnologia e Ciência dos Alimentos, RS. UNOPAR. **Cient Ciênc Biol Saúde**; v. 15, n. 1, 2013.

SGARBIERI, V. C.; PACHECO, M. T. B.; GIBRIN, N. F.; OLIVEIRA, D. A. G.; SILVA, M. E. C. Importance of Diet, Genetic and Lifestyle on Human Aging, Health and Cognition. **Book Publisher Internacional**, 2020.

OBJETIVOS

OBJETIVO PRINCIPAL

O principal objetivo do trabalho foi a caracterização de amostras comerciais de peptídeos de colágeno hidrolisados de diferentes fontes (bovino, pescado e suíno) e avaliar seu potencial biofuncional como antioxidante e hipoglicemiante.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Os objetivos específicos do trabalho foram:

- Caracterização físico-química da matéria-prima (composição centesimal: proteínas, umidade e cinzas e grau de hidrólise);
- Composição do perfil aminoacídico total e livres;
- Determinação do perfil de hidrofiliicidade;
- Determinação da atividade antioxidante: ABTS, ORAC e capacidade de inibição de quebra do DNA *supercoiled plasmidial*;

- Determinação da atividade hipoglicemiante pela atividade de inibição de e alfa-amilase e alfa-glicosidase.

CAPÍTULO 1

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

1. *Proteína de Colágeno*

Segundo dicionários atuais, a palavra colágeno é definida como sendo uma proteína fibrilar de função estrutural, presente na matriz extracelular do tecido conjuntivo de animais. O colágeno é a proteína mais abundante em mamíferos, constituindo quarta parte do seu peso total (DAMODARAN *et al.*, 2010).

Sua principal função é contribuir com a integridade estrutural da matriz extracelular ou ajudar a fixar células na matriz, além de ser quimicamente inerte (WOLF, 2007; MORETTI, 2009). Devido ao colágeno possuir grupos hidrofóbicos na parte exterior, representa uma exceção à regra de que os grupos hidrofóbicos precisam estar escondidos no interior da molécula proteica (SILVA e PENNA, 2012). Sendo que o núcleo hidrofóbico, portanto, contribui menos para a estabilidade estrutural da molécula, enquanto as ligações covalentes assumem um papel especialmente importante (LEHNINGER, 1995).

O colágeno representa cerca de 30% de toda a proteína do organismo dos vertebrados, inclusive dos humanos (HORN *et al.*, 2009). Constitui o componente mais importante do tecido conjuntivo, representando 90% da matriz orgânica do osso, 25% de colágeno de toda a massa óssea; 85% nos tendões, cerca de 75% na pele; 70% nos ligamentos; 70% nas articulações; 6% nos tecidos musculares (SIEBRECHT, 2018).

Além do colágeno estar presente nos tecidos do organismo humano e proporcionar a estabilidade e integridade estrutural de tecidos e órgãos, o colágeno é considerado nas indústrias de alimentos e bebidas como um alimento moderno que melhora a elasticidade, consistência e estabilidade dos produtos na aplicação

como suplementos alimentares proteicos, transportadores, aditivos alimentares, filmes comestíveis e revestimentos (HASHIM *et al.*, 2015).

Segundo Gomez-Guillén *et al.* (2011), as propriedades tecnológicas do colágeno nos alimentos estão na capacidade de gelificação, ligação com a água, texturização, emulsão, formação de espuma, estabilização, adesão e coesão, função colóide protetora e formação de filme. Além disso, o colágeno é um bom agente tensoativo e demonstra sua capacidade para penetrar em uma interface livre de lipídios (LEE *et al.*, 2001).

Ademais, possui atividade hemostática, biodegradabilidade, baixa alergenicidade, alta antigenicidade e biocompatibilidade, e por isso o colágeno tem sido aplicado também em indústria farmacêutica (SANTOS *et al.*, 2013).

Uma característica específica do colágeno está na presença de aminoácidos glicina, prolina, lisina, hidroxilisina, hidroxiprolina e alanina, em suas cadeias peptídicas que estão organizadas de forma paralela a um eixo que proporcionam resistência e elasticidade à estrutura presente (DAMODARAN *et al.*, 2010; CAMPBELL, 2000; LINDEN e LORIENT, 2000).

2. Estrutura e Síntese de Colágeno no Organismo Humano

O colágeno é um filamento de 300 nm de comprimento e 1,5 nm de diâmetro, formado durante a regeneração e no desenvolvimento do tecido embrionário. A síntese de colágeno se inicia no retículo endoplasmático granular (REG) seguido da síntese da cadeia α que possuem sequências de aminoácidos e nas extremidades encontram-se o grupo amino e carboxila. Cada cadeia α é codificada por um ácido ribonucleico mensageiro distinto (RNAm) e modificada no REG. Alguns resíduos dos aminoácidos prolina e lisina já são hidroxilados num processo denominado de modificação pós-traducional que requer o ácido ascórbico (Vitamina C) como um cofator para formar os aminoácidos hidroxiprolina e hidroxilisina, respectivamente (GARTNER e HIATT, 2007).

Subsequentemente, três moléculas da cadeia α se alinham umas às outras e se entrelaçam formando uma molécula de configuração helicoidal, conhecida

como molécula de pró-colágeno (solúvel). A molécula deixa o REG, em seguida é transportada para o Complexo de Golgi onde é secretado (CANTY e KADLER, 2005).

Na matriz extracelular (MEC) do tecido conjuntivo ocorre o descarregamento das moléculas de pró-colágeno, através da enzima pró-colágeno peptidase. Ademais, ocorre a clivagem de duas estruturas globulares ligadas às extremidades não-helicoidais do pró-colágeno. Uma delas, contém nitrogênio e carbono terminais, favorecendo a transformação do procolágeno (parte colágena e não-colágena) em tropocolágeno (parte colágena) (Figura 1).

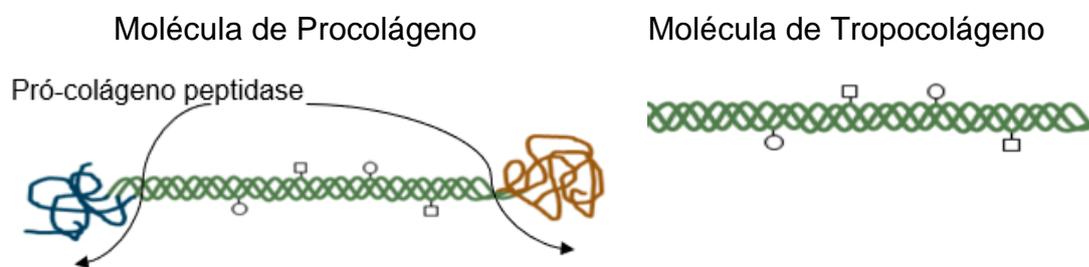


Figura 1. Representação esquemática da diferença da estrutura de procolágeno e tropocolágeno. Fonte: Próprio autor

A quebra das estruturas globulares é necessária para a formação da molécula de tropocolágeno que ocorre pela auto-agregação das moléculas de tropocolágeno em um processo de superposição semelhante a uma escada, transformando as fibrilas de colágeno. O conjunto de fibrilas forma as fibras de colágeno, que se organizam em feixes (LINDEN e LORENT, 2000) (Figura 2).

Existem colágenos fibrilares (dos tipos I, II, III e V) que ocorre a formação das fibrilas colágenas, em contrapartida o colágeno tipo IV é considerado um colágeno não-fibrilar, pois não ocorre a clivagem das estruturas globulares da molécula de pró-colágeno impedindo a formação de fibrilas colágenas (KIERSZENBAUM, 2008).

Por sua vez, o tropocolágeno é considerado uma unidade fundamental para a formação da estrutura do colágeno (SIONKOWSKA, 2006), sendo constituído por

três cadeias polipeptídicas denominadas α , que possuem forma helicoidal, estas cadeias enrolam-se formando a tripla-hélice, através de ligações de hidrogênio, interações hidrofóbicas e eletrostática que influenciam na estabilidade da hélice de colágeno (DAMODARAN; PARKIN; FENNEMA, 2019).

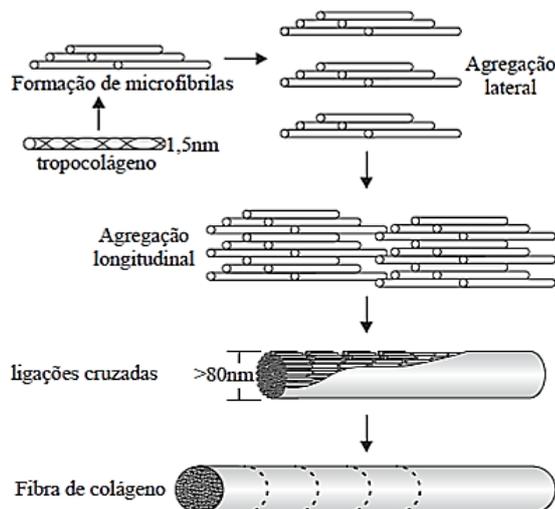


Figura 2. Representação esquemática do processo de formação de moléculas de tropocolágeno em fibrilas e fibras de colágeno (CHAUDRY *et al.*, 1997).

Para a formação da tripla-hélice (Figura 3) é preciso que resíduos de glicina (Gly) ao longo da cadeia auxiliem na formação da unidade repetida do triplete Gly - X - Y na sequência de aminoácidos, sendo X a prolina (Pro) e Y a hidroxiprolina (Hyp). A tripla-hélice de colágeno nativo é altamente resistente à ação da maioria das proteases. Entretanto, a ação da colagenase (enzima que quebra a ligação peptídica do colágeno) torna a molécula do colágeno um alvo fácil para outras enzimas proteolíticas. As células de tecido conjuntivo sintetizam uma série de proteases capazes de atuar sobre o colágeno em condições fisiológicas (FERREIRA *et al.*, 2012).

A tripla-hélice é um dos fatores importantes para que o colágeno forneça suporte estrutural e resistência à tração a vários tecidos do organismo humano e animais vertebrados, incluindo pele, ligamentos, tendões e ossos. Outro fator, é a presença de Pro e Gly, aminoácidos responsáveis pela estabilidade e regeneração das cartilagens apresentando efeitos benéficos ao organismo (WALRAND *et al.*, 2008).

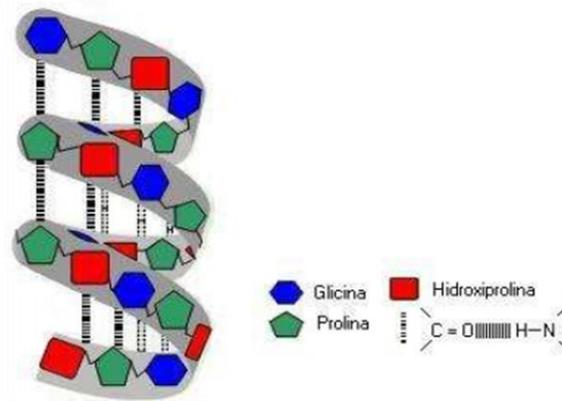


Figura 3. Representação esquemática da estrutura da hélice tripla do colágeno (Adaptado de Brodsky; Ramshaw, 1997 por Pedroso; Plepis, 2009).

Contudo, outra unidade fundamental na síntese de colágeno está presente no tecido conjuntivo reticular, denominado de fibroblastos. Os fibroblastos são células que sintetizam e secretam proteoglicanos, glicoproteínas, moléculas precursoras de vários tipos de colágenos e elastina, sendo os dois últimos encontrados na membrana basal. Mais especificamente, os colágenos tipo IV presente na lâmina basal e o colágeno tipo III aparece na lâmina reticular das membranas basais como um componente das fibras reticulares (KIERSZENBAUM, 2008).

Entretanto, existem outras células equivalentes ao fibroblasto que também sintetizam colágeno e estão presentes nos ossos, na cartilagem e nos dentes denominadas de osteoblastos, condroblastos e odontoblastos, respectivamente (KIERSZENBAUM, 2008).

3. *Composição Aminoacídica do Colágeno*

A composição aminoacídica do colágeno é singular, em virtude de que não é constituído pela maioria dos aminoácidos essenciais e pela inexistência do aminoácido triptofano. Ademais, possui concentrações muito baixas de metionina, cistina e tirosina, sendo o colágeno caracterizado por ser uma proteína de qualidade nutricional pobre para a dieta humana. Entretanto, a sua composição

atípica é essencial para sua síntese nos tecidos conjuntivos e cartilagem (PRESTES, 2013).

A composição química do colágeno é representada principalmente pelos aminoácidos mais significativos, como a glicina (33%), prolina (12%), hidroxiprolina (11%) e hidroxilisina (0,7%). Uma característica que diferencia o colágeno de outras proteínas é a presença da alta concentração desses respectivos aminoácidos (GOISSIS, 2008). Sendo a hidroxiprolina, aminoácido exclusivo do colágeno, denominado de iminoácido (DAMODARAN et al., 2010).

Além da composição aminoacídica, possui uma estrutura de um formato singular de uma tripla-hélice constituída pelos aminoácidos: Glicina (Gly) ao longo da cadeia que auxiliam na formação da unidade repetida do triplete Gly-X-Y na sequência de aminoácidos, sendo X a prolina (Pro) e Y a hidroxiprolina (Hyp) (Figura 4).

A tripla-hélice é um dos fatores importantes para que o colágeno forneça suporte estrutural e resistência à tração a vários tecidos do organismo humano e animais vertebrados, incluindo pele, ligamentos, tendões e ossos. A presença de Pro e Gly, aminoácidos responsáveis pela estabilidade e regeneração das cartilagens, apresentam efeitos benéficos ao organismo (WALRAND et al., 2008). Outro fator, segundo Gómez-Guillé *et al.* (2002), a Pro e Hyp são aminoácidos responsáveis pela estrutura secundária do colágeno e pela estabilidade da tripla-hélice, logo, quando submetido em temperatura elevada ocorre rompimento das ligações. Um fator importante que influencia na perda da conformação tripla-hélice do colágeno é ausência ou menor quantidade de hidroxiprolina (GOMÉZ-GUILLÉN *et al.*, 2002).

O colágeno nativo é insolúvel em água, em virtude da grande concentração de aminoácidos hidrofóbicos, tanto no interior da proteína, como na superfície (LEHNINGER, 1995). Devido ao colágeno possuir grupos hidrofóbicos na parte exterior, representa uma exceção à regra de que os grupos hidrofóbicos precisam estar escondidos no interior da molécula proteica (SILVA e PENNA, 2012). Sendo que o núcleo hidrofóbico, portanto, contribui menos para a estabilidade estrutural

da molécula, enquanto as ligações covalentes assumem um papel especialmente importante (LEHNINGER, 1995).

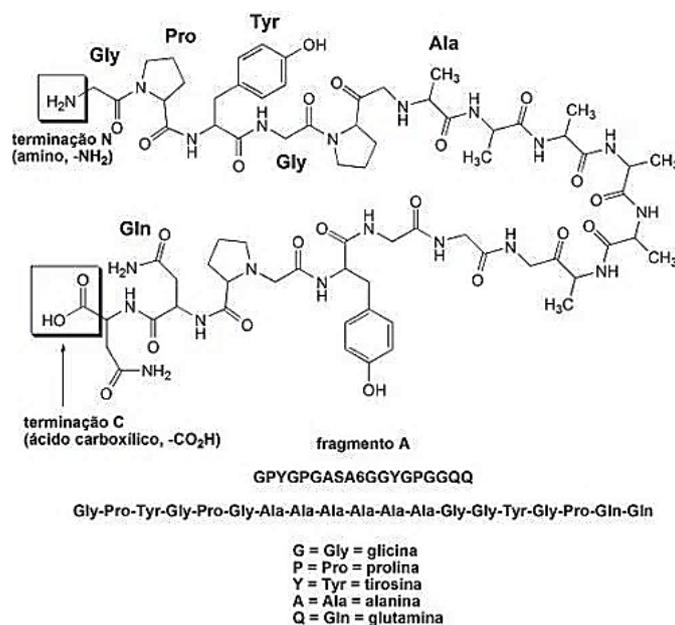


Figura 4. Estrutura molecular e aminoacídica do colágeno (Adaptado de Brodsky; Ramshaw, 1997 por Pedroso; Plepis, 2009).

4. Colágeno Hidrolisado e suas Fontes

O colágeno hidrolisado é derivado do colágeno nativo e é um subproduto de matadouros e frigoríficos, extensivamente utilizado como ingrediente na indústria, depois de extraído em água a 50 a 60°C ou através de reações enzimáticas. A diferença em relação ao colágeno nativo é que estas proteínas são solúveis em água ou em salmoura e apresentam elevado conteúdo proteico (84 a 90%). Sua utilização deve-se pela capacidade de retenção de água e alto teor proteico (PRESTES, 2013). A utilização do colágeno hidrolisado na indústria é ampla devido a sua alta solubilidade proporcionando grande potencial de aplicação em produtos cosméticos, farmacêuticos e alimentícios (MORAES, 2012).

Na indústria de cosméticos, o colágeno hidrolisado tem sido usado como umectante na produção de cremes, tendo grande apelo comercial já que o colágeno presente nas camadas inferiores da pele é responsável pela sua firmeza e elasticidade (BAILEY, LIGHT, 1994). E ainda, possui atividade hemostática,

biodegradabilidade, baixa alergenicidade, alta antigenicidade e biocompatibilidade, e por isso o colágeno tem sido aplicado também em indústria farmacêutica (SANTOS *et al.*, 2013).

Na indústria farmacêutica, é utilizado para curativos de ferimentos e queimaduras, agente hemostático, veículo para medicamentos, lentes de contato e biopróteses (PEDREIRA, 2012). O colágeno hidrolisado é reconhecido como um nutracêutico seguro, cuja combinação de aminoácidos estimula a síntese de colágeno nas cartilagens e na matriz extracelular de outros tecidos (PORFÍRIO, FANARO, 2016).

Além do colágeno estar presente nos tecidos do organismo humano e proporcionar a estabilidade e integridade estrutural de tecidos e órgãos, o colágeno é considerado nas indústrias de alimentos e bebidas como um alimento moderno que melhora a elasticidade, consistência e estabilidade dos produtos na aplicação como suplementos alimentares proteicos, transportadores, aditivos alimentares, filmes comestíveis e revestimentos (HASHIM *et al.*, 2015).

O controle da distribuição do peso molecular (tamanho) do colágeno hidrolisado é um meio de assegurar o controle do processo de fabricação. Outra característica importante é a sua composição elevada de glicina e prolina, dois aminoácidos essenciais para a estabilidade e regeneração das cartilagens (WALRAND, 2008).

Segundo Prestes (2013), a distribuição do peso molecular, estrutura, composição e propriedades funcionais, dependem das condições de processamento, matéria-prima e especificidade da enzima utilizada na obtenção de colágeno hidrolisado.

O colágeno hidrolisado pode ser obtido de diversas espécies animais, principalmente de origem bovina, suína e pescado. No Brasil, a maior parte do colágeno é proveniente dos subprodutos da indústria de carne, em função da elevada produção brasileira de carne para exportação (SILVA e PENNA, 2012). No entanto, a crescente valorização de subprodutos industriais do colágeno originou o

interesse em efetuar sua extração a partir de diferentes espécies de animais (SILVA e PENNA, 2012).

Resíduos do processamento de animais vertebrados são reaproveitados pelas indústrias para a obtenção de colágeno nativo, sendo as principais fontes a pele, carne suína, couro e ossos bovinos (GÓMEZ-GUILLÉN *et al.*, 2011). Por outro lado, resíduos de pescado também são fontes de colágeno e de enzimas importantes (colagenases, tripsina, quimotripsina e pepsina) (OLIVEIRA *et al.*, 2017). Além do mais, estudos comprovaram que existe colágeno também nos invertebrados (medusas, lulas, pepinos-do-mar, corais e anêmonas-do-mar) (ZEMGOLIS, RAGHUNATH, 2011; SIDDIQUI *et al.*, 2013; JANKANGRAM, CHOOLUCK, POMTHONG, 2016).

Dentre outros organismos utilizados para obtenção de colágeno, destacam-se os pescados, especialmente devido a disponibilidade, ausência de risco de transmissão de doenças, barreiras religiosas, alto rendimento no processo de extração e ausência de toxicidade (KRISHNAMOORTHY *et al.*, 2017).

A partir do colágeno nativo podem ser obtidos a fibra de colágeno, o colágeno parcialmente hidrolisado (gelatina) e o colágeno hidrolisado. Cada um destes derivados apresenta características próprias que são dependentes da matéria-prima, processo de extração (químico ou enzimático) e do tempo e temperatura de obtenção (PRESTES, 2013). A maior parte da gelatina comercial (95%) é feita a partir de pele de suíno e bovino e a parte restante (5%) vem a partir de ossos destes animais. Subprodutos de aves e pescados são raramente usados como um recurso de gelatina (SILVA, 2016). Nurimala *et al.* (2020), estudaram subprodutos de pescado, como pele, osso e até bexiga natatória para serem alternativas para a produção de colágeno hidrolisado.

5. Peptídeos Bioativos

Diversas fontes proteicas têm sido utilizadas para a prospecção de peptídeos com bioatividade fisiológica, sendo essas fontes animais, vegetais e microbiológicas. Quanto às fontes animais, as matrizes mais utilizadas são ovos, leite (caseína e soro de leite), carne e pescados. Das fontes vegetais, as matrizes

mais utilizadas são a soja e leguminosas como feijão, lentilha, ervilha e grão de bico (SÁNCHEZ, VÁZQUEZ, 2017). Com relação a fontes de origem microbiológicas têm sido encontrados como produtos da fermentação de bactérias, principalmente as lácticas (CHAKRABARTI *et al.*, 2018).

O processo de hidrólise enzimática do colágeno produz peptídeos de pequeno peso que são considerados suplementos alimentares, sendo que apresentam alegações de bioatividade fisiológica. Para ser considerado peptídeo bioativo de colágeno a hidrólise deve acontecer de maneira específica e controlada (OESEER *et al.*, 1999).

Existem vários tipos de hidrólise, pelo processo enzimático, térmico e químico. No entanto, a hidrólise térmica e/ou química não apresenta um padrão de quebra da proteína e produz peptídeos de colágeno sem qualquer uniformidade e especificidade, não sendo possível atribuir efeitos biológicos como peptídeo bioativo de colágeno (OHARA *et al.*, 2020). A hidrólise enzimática é comumente a mais empregada devido à especificidade das enzimas na quebra das ligações peptídicas em aminoácidos específicos, fornecendo maior controle tanto no peso dos peptídeos, sequência e composição dos aminoácidos no produto final (SCHMIDT, SALAS-MELLADO, 2009).

O termo peptídeo é utilizado para denominar a sequência de dois ou mais aminoácidos unidos através de ligações peptídicas (MARZZOCO, TORRES, 2015). São classificados como dipeptídeos quando formado por dois aminoácidos, tripeptídeos quando formado por três aminoácidos e assim sucessivamente, até aqueles de cadeias peptídicas longas denominadas de oligopeptídios (MOHANTY *et al.*, 2016).

Conceitualmente, os peptídeos são fragmentos que se encontram inativos, ou criptografados na proteína nativa, os quais ao serem liberados através da hidrólise proteica podem exercer diferentes bioatividade (SGARBIERI *et al.*, 2020). Alguns destes peptídeos gerados têm estruturas que permitem sua interação com o organismo de modo similar aos peptídeos endógenos (MACHADO *et al.*, 2004), atuando na expressão de respostas fisiológicas do metabolismo.

Essa interação, permite que os peptídeos gerados na hidrólise das proteínas sejam classificados como bioativos, pois tem o poder de contribuir com efeito benéfico à saúde humana de diversas maneiras: podem ser antioxidantes, anti-hipertensivos, antidiabéticos, entre muitas outras funções que não são encontradas nas proteínas não hidrolisadas (CHAKRABARTI *et al.*, 2018).

Baseado na bioatividade dos peptídeos têm-se desenvolvido vários estudos de pesquisa, os quais estabelecem suas funcionalidades através de ensaios validados pela literatura, sendo associados a possível prevenção de doenças crônicas não transmissíveis (DCNT), como doenças cardiovasculares, alguns tipos de câncer, diabetes Mellitus, *Alzheimer* e entre outras (KITTS, WEILER, 2003; SARMADI, ISMAIL, 2010; MOHANTY *et al.*, 2016; CICERO, FOGACCI, COLLETTI, 2017).

Os peptídeos bioativos podem apresentar capacidade antioxidante, neutralizando espécies reativas de oxigênio derivadas da respiração celular, ajudando o organismo no combate ao estresse oxidativo. Outros benefícios atribuídos aos peptídeos são antibiose, redução do colesterol no sangue, antitrombose, entre outras (MAESTRI *et al.*, 2016, SÁNCHEZ, VÁZQUEZ, 2017; CHAKRABARTI *et al.*, 2018).

Pelo exposto, os peptídeos bioativos são cada vez mais reconhecidos pelo seu potencial em contribuir na manutenção de saúde favorecendo o processo anabólico, sendo que os peptídeos de colágeno nos últimos anos estão ganhando destaque na indústria farmacêutica, como um ingrediente suplementar a dieta para auxiliar no processo de envelhecimento e, estão relacionados na prevenção de doenças, como o envelhecimento celular (KÖNIG *et al.*, 2018; OERTZEN-HAGEMANN *et al.*, 2019; JENDRICKE *et al.*, 2019).

5.1. Peptídeos de Origem Animal

O crescimento da população mundial levou ao aumento da demanda por produtos de origem animal, e a tendência é que continue a crescer (LAFARGA *et al.*, 2017). Atualmente, a principal fonte proteica alimentar é de origem animal, seja através do consumo de carne bovina, suína e peixes ou ingestão ovos, leite e seus

derivados. Segundo um levantamento do Departamento de Agricultura do Estados Unidos (USDA) sobre o consumo mundial de carne bovina mostra uma tendência ascendente na demanda desse alimento. Em 2017, o consumo era de 57 mil toneladas (equivalentes em peso de carcaça), enquanto em junho de 2019 esse valor subiu para 59 mil toneladas, com os principais consumidores sendo, Estados Unidos, China e União Europeia (USDA, 2020). Cada vez mais as populações mundiais, em especial de países desenvolvidos, buscam saudabilidade, através de informação. Os consumidores estão cada vez mais exigentes e preocupados em alimentar-se de forma nutritiva, sendo que os estudos de pesquisa proporcionam conhecimento do potencial dos alimentos, em especial dos peptídeos bioativos, para uma vida saudável.

Recentemente, Yu *et al.* (2020), analisaram o efeito imunomodulador em camundongos imunossuprimidos induzidos de peptídeos de baixo peso molecular, obtidos através do hidrolisado de proteínas da pele de Nibeia Japônica. Os peptídeos estudados aumentaram positivamente os índices bioquímicos de imunidade, melhoraram o peso corporal dos camundongos tratados e restauraram a histomorfologia patológica dos órgãos imunes, mostrando-se um imunomodulador promissor.

Li *et al.* (2020), hidrolisaram a clara de ovo em pó utilizando as enzimas comerciais Alcalaze® e Flavourzyme®, obtendo o peptídeo KR-9, o qual, a partir de testes em células em ensaio “*transwell*”, facilitou a migração de fibroblastos, sendo esta etapa fundamental para a cicatrização de ferimentos. O peptídeo da clara de ovo também promoveu a cicatrização de feridas na pele de ratos quando aplicados sobre a superfície, por estimulação de secreção da membrana celular Hsp90a.

Peptídeos bioativos do colostro bovino fermentado por bactérias constituintes da microbiota de grãos de kefir foram estudados por GASPAR-PINTILIESCU *et al.* (2019) e mostraram elevada inibição da enzima conversora de angiotensina (ECA). Os valores semelhantes ao exercido por 5 ng/mL do medicamento Captopril, utilizado para o tratamento da hipertensão, comprovando por este mecanismo sua ação anti-hipertensiva. Com relação à atividade

antioxidante, o extrato peptídico apresentou alta atividade de eliminação dos radicais ABTS, e se mostrou não citotóxico.

Com a finalidade de desenvolver um método rápido e eficiente de extração de peptídeos antioxidantes, Zou *et al.* (2016) hidrolisou cérebros de porco pré-tratados por ultrassom e comparou com hidrolisados por enzimólise tradicional. Os hidrolisados que passaram pelo pré-tratamento por ultrassom apresentaram menor peso molecular, maior concentração de peptídeos hidrofílicos e peptídeos hidrofóbicos com eluição tardia. Ambos os hidrolisados apresentaram peptídeos antioxidantes, com atividade acima de 60%. O hidrolisados com pré-tratamento se mostraram mais solúveis e apresentaram efeito de eliminação de radicais DPPH e ABTS. Os resultados mostraram que o hidrolisado pré-tratado possuiu boas propriedades funcionais como potencial ingrediente alimentar antioxidante.

Outros estudos sobre peptídeos de origem animal e seus potenciais bioativos podem ser vistos na tabela 1.

Tabela 1. Peptídeos de origem animal e seus potenciais bioativos.

Fontes animais				
Origem	Obtenção	Efeito bioativo	Método Experimental	Referência
Leite Bovino	Lactoferrina comercial	Anti-câncer	<i>In vitro</i> : cultura de células Jurkat T-leucemia e células de câncer de mama MDA-MB-231	Arias et al. (2017)
Colágeno de ossos bovinos	Obtidos da gelatina de ossos bovinos com as enzimas alcalase e collagenase	Combate ao envelhecimento cronológico da pele, aumento da ação antioxidante do organismo, reposição de colágeno.	<i>In vivo</i> : estudo aplicado em ratos	Song et al. (2017)
Caseína de búfalo e bovina	Hidrolisadas com as enzimas alcalase, tripsina, pepsina e papaina.	Atividade antioxidante	<i>In vitro</i> : atividade antioxidante por ABTS, ORAC, FRAP	Shazly et al. (2019)

Peito de frango	Digestão gastrointestinal simulada	Atividade anti-hipertensiva (inibição da enzima de conversão da angiotensina - ECA)	<i>In vitro</i>	Sangsawad et al. (2017)
Casca de camarão	Hidrólise enzimática (Neutrase, alcalase, tripsina, papaína e protamex)	Hipoglicemiante	<i>In vitro</i> (inibição enzima α -amilase)	Yuan et al. (2018)
<i>Mytilus edulis</i> (mexilhão)	Hidrólise enzimática	Atividade antitrombótica	<i>In vitro</i>	Quiao et al. (2018)

6. Estresse Oxidativo e Antioxidantes

O estresse oxidativo pode sobrecarregar os sistemas antioxidantes fisiológicos normais, favorecendo o envelhecimento celular e orgânico, migração celular ou neoplástica, proliferação, senescência ou morte (STORZ, 2011). Ademais, pode contribuir para a patogênese de várias doenças neurodegenerativas humanas, como *Alzheimer* e *Parkinson* (SGARBIERI *et al.*, 2020).

No organismo existe um sistema de defesa antioxidante contra espécies reativas de oxigênio (EROs) e radicais livres que são constantemente formados no processo aeróbio diário, pelas fontes dietéticas e células imunes ativadas por nitrogênio. Todavia, quando ocorre uma produção excessiva de “espécies de radicais livres”, podem ocasionar a oxidação de moléculas biológicas provocando um desequilíbrio entre o processo oxidativo e a capacidade de defesa antioxidante do organismo, ocasionando um estresse oxidativo (MACHADO *et al.*, 2009).

O termo radical livre refere-se a átomo ou conjunto de moléculas orgânicas e inorgânicas que contêm em sua estrutura um ou mais elétrons desemparelhados, isto é, possui em sua camada eletrônica um número ímpar de elétrons e são altamente reativos (HALLIWELL e GUTTERIDGE, 1990). Os radicais livres podem ser agentes ou produto de reações de óxido-redução, podendo ceder o elétron não pareado, oxidando-se, ou receber outro elétron, reduzindo-se (FERREIRA e MATSUBARA, 1997). O termo “espécies radicais livres” muito utilizado para identificar a origem dos radicais livres, contém uma série de espécies radicalares ou não radicalares derivadas tanto do oxigênio ERO (espécies reativas de

oxigênio), quanto do nitrogênio ERN (espécies reativas de nitrogênio) (ANGELI, 2011).

Segundo Halliwell, Gutteridge, Cross (1992), as EROs estão relacionadas com várias patologias, tais como artrite, choque hemorrágico, doenças do coração, catarata, disfunções cognitivas, câncer e AIDS, podendo ser a causa ou o fator agravante do quadro geral. Contudo, para evitar essas doenças, a ingestão de alimentos ou componentes de alimentos que apresentam propriedades antioxidantes pode auxiliar na prevenção ou tratamento desse desequilíbrio.

Desse modo, nas últimas décadas, vários estudos determinaram a capacidade de alguns peptídeos bioativos provenientes de colágeno com propriedades antioxidantes. Estas podem auxiliar e proteger células do estresse oxidativo pela captura dos radicais livres, além de proporcionarem efeitos anti-inflamatório, anti-hipertensivo e antimicrobiano (Tabela 2).

Tabela 2. Peptídeos de colágeno e seus efeitos bioativos.

Origem	Obtenção	Efeito bioativo	Método Experimental	Referência
Hidrolisado de Colágeno bovino	Gelatina de ossos bovinos com as enzimas alcalase e colagenase.	Combate ao envelhecimento cronológico da pele, aumento da ação antioxidante do organismo, reposição de colágeno.	<i>In vivo</i>	Song <i>et al.</i> (2017)
Hidrolisado de músculo de atum	Enzimas pepsina, tripsina, neutrase, papaína e alcalase	Potencial antioxidante	<i>In vitro</i> : DPPH, OH• e O2•-	Chang-Feng <i>et al.</i> (2015)
Colágeno pele de tilápia	-	Potencial antioxidante	<i>In vitro</i> : DPPH e ABTS.	Zhang <i>et al.</i> (2016)
Hidrolisado de colágeno da pele suína	-	Potencial antioxidante	<i>In vitro</i> : DPPH, AQM, SPAL,	Li, <i>et al.</i> (2011)

Hidrolisado de Colágeno suíno	-	Potencial antioxidante	DPPH (Bersuder <i>et al.</i> 1998)	Ao e Li (2012)
Hidrolisado de Colágeno comercial bovino	-	Potencial efeito do colágeno nos sinais de envelhecimento da pele através do metabolismo de fibroblastos	<i>In vitro</i> : cultura de células dérmicas humanas (Fibroblastos)	Zague <i>et al.</i> (2018)
Hidrolisado de Colágeno de pele de atum	Hidrólise com água subcrítica	Potencial antioxidante e antimicrobiano	<i>In vitro</i> : ABTS, DPPH, FRAP, atividade quelante e efeito antimicrobiano	Ahmed e Chun (2018)
Hidrolisado de colágeno comercial bovino	-	Potencial efeito contra sarcopenia	<i>In vivo</i>	Oertzen-Hagemann <i>et al.</i> (2019)
Hidrolisado de colágeno de frango	Hidrólise enzimática (Protease M, Alcalase, Protex 50 FP e Protex 51FP)	Potencial efeito anti-inflamatório	<i>In vitro</i> : cultura de células HDFs	Offengenden <i>et al.</i> (2018)
Hidrolisado de colágeno comercial bovino	-	Redução de dor nas articulações (joelho) após atividade física	<i>In vivo</i>	Zdziedlik <i>et al.</i> (2017)
Hidrolisado de colágeno de pele de bacalhau	Hidrólise enzimática (Papaína, α -Quimiotripsina, Pepsina, Tripsina, Neutrase e Alcalase)	Potencial anti-hipertensivo	<i>In vitro</i> : Inibição da ECA	Ngo <i>et al.</i> (2016)

Segundo Halliwell (2000): “Antioxidante é qualquer substância que, quando presente em baixa concentração comparada à do substrato oxidável, regenera o substrato ou previne significativamente a oxidação do mesmo”. O excesso de radicais livres no organismo é combatido por antioxidantes produzidos pelo corpo ou absorvidos da dieta (BARREIROS, 2006).

A importância dos antioxidantes é reconhecida pela Organização Mundial da Saúde desde o ano de 1990, a qual recomenda um aumento do consumo de fontes

alimentares ricas em antioxidantes, sendo a ingestão alimentar a principal forma de aquisição desses compostos (WHO, 1990).

Os antioxidantes endógenos (produzidos pelo organismo) agem enzimaticamente, sendo composto por três diferentes sistemas: O primeiro é composto por dois tipos de enzimas, a superóxido dismutase (SOD) responsável por catalizar a desmutação do radical ânion superóxido, convertendo-o em oxigênio e peróxido de hidrogênio (BABIOR, 1997). Além do mais, existem dois tipos de SOD no organismo, a primeira contém cobre e zinco como centros redox e ocorre no citosol, porém não é afetada pelo estresse oxidativo; e a segunda contém magnésio como centro redox, ocorre na mitocôndria e sua atividade aumenta com o estresse oxidativo (BARREIROS, 2006; BABIOR, BRAZ, 1997).

O segundo sistema antioxidante é composto pela enzima catalase (CAT), responsável pela desmutação do peróxido de hidrogênio em oxigênio e água. O terceiro sistema é composto pela glutathiona (GSH) em conjunto com duas enzimas, a glutathiona peroxidase (GPx ou GSH-Px) e a glutathiona redutase (GR ou GSH-Rd). A presença de selênio na enzima (seleno-cisteína) denota a importância desse metal e sua atuação como antioxidante no organismo (BARREIROS, 2006).

Além de sistemas enzimáticos, o organismo também utiliza antioxidantes provenientes da dieta, como a-tocoferol (vitamina-E), β -caroteno (pro-vitamina-A), ácido ascórbico (vitamina-C), e compostos fenólicos onde se destacam os flavonóides e poliflavonóides (PIETTA, 2000; HALLIWELL *et al.*, 1995). O ácido ascórbico é comumente localizado nos tecidos orgânicos do organismo humano na forma de ascorbato, atua como agente redutor, reduzindo metais de transição (Fe^{3+} e Cu^{2+}) presentes nos sítios ativos das enzimas ou nas formas livres no organismo. Ademais, pode ser oxidado pela maioria das ERO e ERN que chegam ou são formadas nos compartimentos aquosos dos tecidos orgânicos (BARREIROS *et al.*, 2006).

Outra possibilidade para avaliações potenciais da atividade antioxidante de um determinado composto puro ou extrato é pelo método *in vitro*. Segundo Bertoldi (2006), uma avaliação *in vitro*, se bem conduzida com a finalidade da utilização de

antioxidantes em alimentos para fins tecnológicos pode fornecer uma estimativa importante do potencial antioxidativo do composto em análise. O equilíbrio entre agentes redutores e o sistema antioxidante é muito importante. Logo quantidades adequadas de antioxidantes no meio intracelular são de grande importância para maior segurança contra os ataques dessas espécies reativas, prevenindo o aparecimento de doenças e evitando suas complicações, principalmente no diabetes mellitus (VALKO, *et al.*, 2007; OLIVEIRA, 2010).

A importância dos antioxidantes é reconhecida pela Organização Mundial da Saúde desde o ano de 1990, a qual recomenda um aumento do consumo de fontes alimentares ricas em antioxidantes, sendo a ingestão alimentar a principal forma de aquisição desses compostos (WHO, 1990).

No entanto, cabe ressaltar que a capacidade de prevenir reações oxidativas não é proveniente somente dos conhecidos antioxidantes naturais. Os peptídeos derivados da digestão proteica também podem exercer atividade antioxidante pelos mesmos mecanismos que os observados para outros antioxidantes. Porém, a exploração de peptídeos antioxidantes requer tecnologias adicionais para liberar sequências de aminoácidos ativos das proteínas, uma vez que as proteínas precursoras podem não apresentar o mesmo efeito antioxidante (CHI *et al.*, 2014; GALLEGO, MORA, HAYES, REIG, TOLDRÁ, 2017; HOMAYOUNI-TABRIZI, ASODEH, SOLTANI, 2017; JEMIL *et al.*, 2016; RIZZELLO *et al.*, 2017; SACHINDRA, BHASKAR, 2008).

Proteínas de carne, leite e peixe foram estudadas e identificadas como fontes importantes de peptídeos bioativos. Sarmadi e Ismail (2010), discutiram vários aspectos relacionados aos peptídeos antioxidantes em destaque sobre a importância dos peptídeos bioativos, particularmente para reações alérgicas. Liu *et al.* (2010) exploraram a composição peptídica em carnes e derivados, juntamente com o papel biológico e potencial em aplicações farmacológicas. Halim, Yusof e Sarbon (2016), avaliaram a aplicação tecnológica da liberação dos peptídeos de proteínas de peixe, como a capacidade de retenção de água e gordura, e os benefícios pretendidos à saúde da atividade antioxidante e outras atividades biológicas. De maneira semelhante, Mohanty *et al.* (2016) revisaram como a

digestão, fermentação e atividade enzimática afetavam a liberação de peptídeos bioativos a partir de proteínas do leite. Os autores também relataram aspectos importantes relacionados à atividade biológica, especialmente como potenciais agentes terapêuticos contra doenças degenerativas não transmissíveis, tais como hipertensão e doenças imunológicas.

A Tabela 3 mostra alguns hidrolisados provenientes de diferentes fontes de proteínas alimentares como provedoras de peptídeos que apresentam atividade antioxidante. Aqui foram destacados os trabalhos provenientes da proteína de gelatina e colágeno. Os autores atribuem a presença de alguns aminoácidos na porção terminal dos peptídeos, tais como prolina e glicina, assim como o peso da cadeia molecular.

Tabela 3. Estudos sobre a atividade antioxidante de peptídeos de diversas fontes proteicas, com destaque ao colágeno e gelatina.

Fontes	Características	Peso Molecular	Referências
Hidrolisado do peixe <i>Liza klunzingeri</i>	-	< 1 kDa	Rabiei et al. (2019)
Extrato aquoso de alpiste	-	-	Oliveira, M. C. M. (2015)
Proteínas do leite de cabra	-	< 2 kDa	(Ahmed, El-Bassiony, Elmalt, & Ibrahim, 2015)
Hidrolisado de colágeno da pele de peixe (Spanish mackerel)	Gly na cadeia principal e Pro nas cadeias laterais	$5.04 \leq \text{MPM} \leq 47.82$ kDa	Chang-Feng et al. (2014)
Lisozima de clara de ovo	-	<3 kDa	Memarpoor-Yazdi, Asodeh, & Chamani, (2012)
Hidrolisado de colágeno suíno	-	-	Ao e Li (2012)

Peptídeos de gelatina de tilápia	Leu-Ser-Gly-Tyr-Gly-Pro	< 2 kDa	Sun, Zhang e Zhuang (2013)
Hidrolisado de colágeno da pele suína	Gln-Gly-Ala-Arg	-	Li, et al. (2011)
Hidrolisado de colágeno da pele de lula	-	7-12 kDa	Liu, et al. (2010)
Hidrolisado protéico de sementes de ervilha	-	-	Pownall, Udenigwe e Aluko (2010)
Hidrolisado de protamina de salmão	Pro-Arg combinando 1–2 e 16–17 resíduos da protamina do salmão	-	Wang et al. (2008)
Hidrolisados de proteínas de canola	-	-	Cumby et al. (2007)
Hidrolizado de gelatina da pele de peixe (Alaska Pollack)	Gly-Pro-Hyp-Gly-Pro-Hyp-Gly-Pro-Hyp-Gly-Pro-Hyp-Gly	1,5 a 4,5 kDa	Kim, Kim, Byun, Park, et al. (2001)

Contudo, existem vários estudos que comprovam que a composição e sequência dos aminoácidos determinam a atividade dos peptídeos, uma vez que processos naturais no organismo são modulados pela interação de sequências de aminoácidos específicas que fazem parte das proteínas (SÁNCHEZ, VÁZQUEZ, 2017; FIELDS, 2009).

No estudo de Alemán *et al.* (2011), os autores evidenciaram que a presença de resíduos de leucina (Leu) na sequência de peptídeo de hidrolisado de gelatina de lula, pode ser um fator importante para atividade antioxidante e inibitória da enzima conversora de angiotensina (ECA). Especificamente, para a inibição da ECA a sequência tripeptídica terminal-C e a presença de um aminoácido hidrofóbico foram determinantes para a inibição, em virtude de que ECA prefere inibidores que contém aminoácidos hidrofóbicos localizado na terceira posição da

sequência do terminal-C, seguidos de glicina (Gly), prolina (Pro), leucina (Leu), fenilalanina (Phe) e serina (Ser), mais especificamente na ordem Gly-Pro-Leu-Gly-Leu-Leu-Gly-Phe-Leu-Gly-Pro-Leu-Gly-Leu-Ser (MURRAY & FITZGERALD, 2007).

De acordo com Banerjee e Shanthi (2016), a presença dos aminoácidos tirosina (Tyr), fenilalanina (Phe), triptofano (Trp), histidina (His), metionina (Met) e prolina (Pro) nas sequências peptídicas aumentam a quelação e a eliminação dos radicais livres, em razão de que aminoácidos aromáticos Phe, Tyr, Trp e His podem doar prótons proporcionando a eliminação desses radicais (TOLDRÁ *et al.*, 2017). Para Zhang *et al.* (2019), os aminoácidos hidrofóbicos Ala, Val e Leu, também podem desempenhar um importante papel para a atividade imunomodulatória.

Pode se dizer, que a sequência de aminoácidos de peptídeos hidrolisados é um fator importante para determinar sua bioatividade. Essa observação pode ser indicada pela melhora da cicatrização de feridas cutâneas em camundongos, ou melhor, pelo estímulo do crescimento de fibroblastos através da aplicação direta da sequência Pro-Hyp. No entanto, quando foram adicionados os mesmos separadamente não obteve o mesmo efeito (SHIGEMURA *et al.*, 2009). Segundo Sato (2017), o crescimento de fibroblastos é controlado por fatores de fixação na matriz extracelular e presença dos dipeptídeos de colágeno (como Pro-Hyp e Hyp-Gly), assim explica parcialmente os efeitos benéficos da ingestão de colágeno hidrolisado em pacientes que sofrem de úlcera por pressão, melhor dizendo, lesão da pele resultante da pressão prolongada sob a pele (LEE *et al.*, 2006; SUGIHARA *et al.*, 2015).

Além da composição e sequência aminoacídica, o peso molecular dos peptídeos também favorece a propriedade bioativa. De acordo com o estudo de Nurilmala *et al.* (2020), peptídeos de colágeno de pele de atum apresentaram maior atividade antioxidante com peso molecular inferior e superior a 3 kDa e entre 10-30 kDa. Song *et al.* (2017), peptídeos de colágeno provenientes de pele e osso bovino apresentaram efeitos benéficos no fotoenvelhecimento da pele de camundongos envelhecidos cronologicamente, melhorou significativamente a flacidez da pele, reparou as fibras de colágeno, aumentou o conteúdo de colágeno e normalizou a proporção do colágeno tipo I para o tipo III em pele envelhecida cronologicamente.

7. Diabetes Mellitus e Enzimas Gastrointestinais

Segundo a Sociedade Brasileira de Diabetes (2020), diabetes *mellitus* é uma doença crônica não transmissível (DCNT) e considerado um importante e crescente problema de saúde para todos os países, independente do seu grau de desenvolvimento. Em 2019, foram 16,8 milhões de adultos entre 20 a 79 anos de idade diagnosticados com diabetes no Brasil, o sexo feminino é que representa mais os casos de diabetes no país, cerca de 44% de mortes atribuídas a essa doença são de pessoas menores de 60 anos. (IDF, 2019).

O aumento da prevalência do diabetes está associado a diversos fatores, como rápida urbanização, transição epidemiológica, transição nutricional, maior frequência de estilo de vida sedentário, maior frequência de excesso de peso, crescimento e envelhecimento populacional e, também, à maior sobrevivência dos indivíduos com diabetes (SBD, 2020).

O Diabetes Mellitus (DM) é um distúrbio metabólico caracterizado pela elevação da glicose no sangue (hiperglicemia) persistente decorrente da deficiência de produção da insulina ou na sua ação, ou em ambos os mecanismos. Outra característica de DM é a elevada glicemia em jejum e o aumento de concentrações de glicose sanguínea após refeições, devido a uma menor sensibilidade insulínica nos tecidos alvo ou redução da produção de insulina pelo pâncreas (ADA, 2005). Existem cinco tipos de DM, porém as mais comuns são: o diabetes tipo 1 (DM 1) e diabetes tipo 2 (DM 2) (SBD, 2019).

A DM 1, geralmente aparece na infância ou adolescência, mas também pode ser diagnosticado em adultos. A causa é pela diminuição absoluta da secreção de insulina em virtude da destruição de células β -pancreáticas pela doença auto-imune, promovendo a hiperglicemia. Contudo, pacientes com DM 1 devem administrar a insulina exógena para evitar a cetoacidose e reduzir o nível de glicemia (ZIMMET, ALBERTI, SHAW, 2001).

A DM 2 na maioria dos casos (cerca de 90% dos pacientes diabéticos) ocorre em adultos acima de 50 anos, ainda assim, nos últimos anos aumentou o número de jovens e crianças com DM 2, em razão do aumento do consumo de gorduras e

carboidratos aliados à falta de atividade física (SBEM, 2020). Esta doença está associada ao aumento de peso e obesidade, além de ser caracterizada pela resistência à insulina ou pela deficiência da secreção da mesma (ZIMMET, ALBERTI, SHAW, 2001). O tratamento da DM 2 pode ser por vários mecanismos: Estimulação de secreção de insulina endógena, que incluem as sulfoniuréias e meglitinidas; o aumento da sensibilidade à insulina, como as biguanidas e tiazolidinodionas; e a inibição da degradação de oligossacarídeos e dissacarídeos, formado pelos inibidores das enzimas α -amilase e α -glicosidase (CHENG, FANTUS, 2005).

Outros tipos de DM podem ocorrer durante ou pós-gestação, por uma doença pancreática ou por outras doenças endócrinas, além da possibilidade de ser induzida por medicamentos e outras substâncias químicas (SBD, 2020).

As complicações associadas ao DM incluem hipertensão, hipertrigliceridemia (aumento sérico de triglicerídeos), hipercolesterolemia (aumento sérico de colesterol), problemas cardíacos, derrames, problemas oculares, nefropatia (podendo evoluir para insuficiência renal) e neuropatias (podendo evoluir de úlceras nos pés às amputações) que diminuem a qualidade de vida do paciente (SBD, 2016). Entretanto, os principais sintomas da DM são diurese e sede excessiva, aumento do apetite, perda de peso, cansaço, turvação visual e infecções, sendo as mais comuns as infecções de pele (SBD, 2020).

As α -amilases podem ser encontradas em animais, plantas e microrganismos, são enzimas da família endoamilases que catalisam a hidrólise das ligações glicosídicas α -1,4 do amido liberando glicose, maltose, oligossacarídeos e dextrinas. Essas enzimas podem ser secretadas pelas glândulas salivares e pelo pâncreas desempenhando um papel importante na digestão do amido e glicogênio (WHITCOMB, LOWE, 2007). A α -amilase pancreática pode ser obtida de pâncreas suíno e bovino, sendo a suína usada como um auxiliar de digestão e apresenta potencial de uso em rações para animais.

As α -glicosidases estão localizadas nas células intestinais, responsáveis por catalisar a hidrólise das ligações glicosídicas α -1,4 de dissacarídeos e oligossacarídeos e/ou poliglicanos em moléculas menores, denominadas de

monossacarídeos (glicose), enquanto outras glicosidases hidrolisam preferencialmente substratos heterogêneos como sacarose (CHIBA, 1997). Os monossacarídeos são utilizados como fonte de energia e carbono para as células (ALLABY, 1999).

As α -glicosidases são um grupo de exo-glicosídeo hidrolases capazes de clivar os resíduos α -glicosila das extremidades não reduzidas de substratos α ligados para liberar α -D-glicose (CHIBA, 1997). Além disso, as glicosidases são classificadas com a especificidade da clivagem da ligação glicosídica, dependendo do número, posição ou configuração do grupo hidroxila na molécula do açúcar (MELO, GOMES, CARVALHO, 2006).

As enzimas α -glicosidases também, podem ser encontradas em animais, plantas e microrganismos. Ademais, é importante para o metabolismo, como na degradação de polissacarídeos provenientes da alimentação e assim pelo auxílio da geração de glicogênio e glicoproteínas celulares, pela biossíntese e modificação de α -glicoproteínas, e catabolismo de peptidoglicanos (GANEM, 1996). Contudo desempenha funções biológicas tanto para o reconhecimento intercelular, proliferação e diferenciação celular como funções patológicas que auxiliam no câncer e inflamação (MELO, GOMES, CARVALHO, 2006).

As α -amilase humana possuem os domínios: A, B e C. Na α -amilase o sítio ativo, região onde o substrato se liga a enzima, está situado em uma fenda longa entre os domínios A e B, onde também está o cálcio que atua na estabilização da estrutura tridimensional e ativador alostérico. A enzima α -glicosidase é constituída por 4 domínios (A, C, D e N) e 2 subdomínios (B e B'). O domínio A é a região catalítica, o domínio C pode desempenhar uma proteção do domínio catalítico contra solventes, sendo que a capacidade da enzima α -glicosidase em se ligar ao amido pode ser atribuída para o domínio D. O domínio N-terminal interage com o domínio catalítico e pode conter sítios secundários de reconhecimento dos carboidratos. B e B' estão localizados próximos do domínio A proporcionando um papel na ligação da enzima ao substrato (SIM *et al.*, 2008). As estruturas das enzimas estão representadas na figura 5.

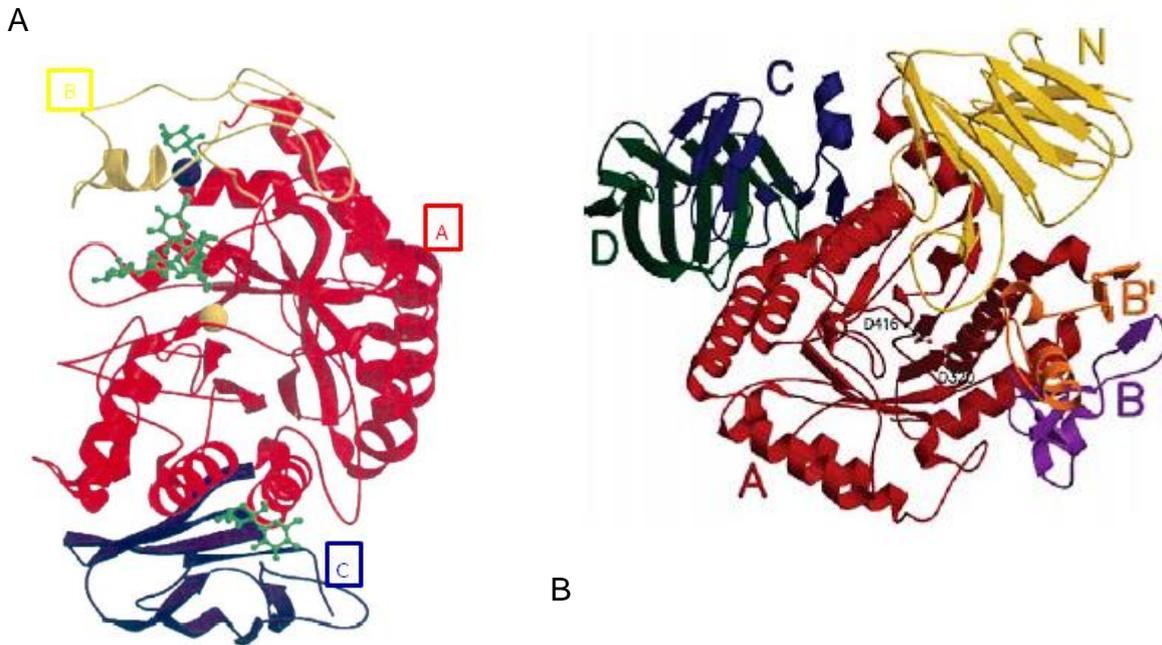


Figura 5. A: Estrutura tridimensional de α -amilase, o íon Ca^{2+} está representado como um esfera azul e o íon cloreto está como esfera amarela. As estruturas verdes são ligantes da enzima na superfície do sítio ativo e na sua fenda. B: Estrutura tridimensional de α -glicosidase (SIM *et al.*, 2008).

8. Mecanismo de Inibição das enzimas α -amilase e α -glicosidase

A inibição das enzimas α -amilase e α -glicosidase é um dos mecanismos que podem auxiliar no tratamento de DM 2, através da captação de carboidratos pelas células intestinais. Logo, a inibição competitiva dessas enzimas reduz a taxa de absorção de monossacarídeos impedindo o aumento da glicemia pós-prandial (PERFETTI *et al.*, 1998).

Segundo Bischoff (1994), inibidores de α -glicosidase (EC 3.2.1.20) retardam a digestão de sacarose e amido, dessa forma são considerados superiores aos inibidores de α -amilase (EC 3.2.1.1.). Em vista disso, a inibição da enzima α -glicosidase (EC 3.2.1.20) é um dos tratamentos eficazes de diabetes mellitus (ABESUNDARA *et al.*, 2004). Foram realizados alguns estudos com essas enzimas para avaliar o potencial anti-diabético (hipoglicemiante) de albumina hidrolisada,

peptídeo de colágeno de peixe, extrato de flores de *C. auriculata*, rabanete japonês, repolho, cebola, couve chinesa, tomate, pepino e cenoura frutas, tangerina, maçã, melancia, melão e toranja, salsa italiana e rúcula (YU *et al.*, 2012; ZHANG *et al.*, 2016; ABESUNDARA, MATSUI, MATSUMOTO, 2004).

Desse modo, o consumo de inibidores provenientes da dieta pode ser uma terapia eficaz para gerenciar a hiperglicemia pós-prandial. O tratamento tradicional é pelo uso do fármaco acarbose (pseudotetrassacarídeo) produzido pelo processo de fungos que provocam efeitos adversos, como distúrbios gastrointestinais, 20% dos pacientes sofrem de desconforto abdominal, diarreias e flatulências (CHIASSON *et al.*, 2002)

Considerando que a digestão de carboidratos se inicia na boca pela α -amilase salivar e continua no intestino com a ação da α -amilase pancreática, a redução ou bloqueio da atividade da enzima α -amilase pode acarretar na redução da degradação de polissacarídeos em glicose, maltose e maltotriose impedindo o aumento da glicemia pós-prandial, proporcionando uma segurança para os diabéticos (Figura 6).

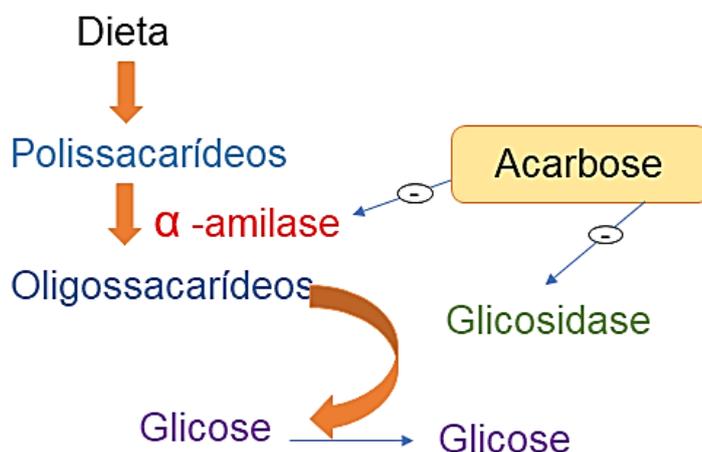


Figura 6. Mecanismo de inibição das enzimas α -amilase e glicosidase. Fonte: Próprio Autor.

Diante do exposto acima o trabalho teve como motivação estudar à interferência das diferentes fontes dos peptídeos de colágeno hidrolisado sob suas

capacidades antioxidantes e por uma possível inibição das enzimas gastrointestinais alfa-amilase e hipoglicemiante que quando inibidas podem favorecer com efeitos hipogliceminas.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABESUNDARA, K. J. M.; MATSUI, T.; MATSUMOTO, K. α -Glucosidase Inhibitory Activity of Some Sri Lanka Plant Extracts, One of Which, *Cassia auriculata*, Exerts a Strong Antihyperglycemic Effect in Rats Comparable to the Therapeutic Drug Acarbose. **J. Agric. Food Chem**, v. 52, p. 2541-2545, 2004.

AHMED, R.; CHUN, B. Subcritical water hydrolysis for the production of bioactive peptides from tuna skin collagen. **The Journal of Supercritical Fluids**, v. 141, p. 88-96, 2018.

AHMED, S. A.; TAWFIK, E.; ELMALT, L. M.; IBRAHIM, H. R. Identification of potent antioxidant bioactive peptides from goat milk proteins. **Food Research International**, p.1-32, 2015.

ALEMÁN, A.; GIMÉNES, B.; PÉREZ-SANTIN, E.; GÓMEZ-GUILLÉN, M.C.; MONTERO, P. Contribution of Leu and Hyp residues to antioxidant and ACE-inhibitory activities of peptide sequences isolated from squid gelatin hydrolysate. **Food Chemistry**, v. 125, n.2, p. 334-341, 2011.

ANGELI, J. P. F. **Hidroperóxidos de lipídios como fontes de oxigênio molecular singlete, detecção e danos em biomoléculas**. Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo, p. 35-37, 2011.

AO, J.; LI, B. Amino acid composition and antioxidant activities of hydrolysates and peptide fractions from porcine collagen. **Food Science and Technology International**, v. 18, n. 5. p. 426-434, 2012.

ARIAS, M.; HILCHIE, A. L.; HANEY, E. F.; BOLSCHER, J. G. M.; HYNDMAN, M. E.; HANCOCK, R. E. W.; VOGEL, H. J. Anticancer activities of bovine and human lactoferricin-derived peptides. **Biochemistry and Cell Biology**, v.95, n.1, p.91–98, 2017.

ASOODEH, A.; YAZDI, M. M.; CHAMANI, J. Purification and characterisation of angiotensin and converting enzyme inhibitory peptides from lysozyme hydrolysates. **Food Chemistry**, v.131, n.1, p. 291-295, 2012.

BABIOR, B. M. Superoxide: a two-edged sword. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 30, p. 141-155, 1997.

BAILEY, A. J.; LIGHT, N. D. Connective tissue in meat and meat products. Barking: Bischoff, H. Pharmacology of R-glucosidase inhibition. **Journal.Clin. Invest.**, v. 24, n.3, p. 3-10, 1994.

BARREIROS, A. L. B. S.; DAVID, J. M.; DAVID, J. P. Estresse oxidativo: relação entre gerações de espécies reativas e defesa do organismo. **Química Nova**, v. 29, n. 1, p. 113-123, 2006.

BERGER, P.; LEITNER, N. K. V.; DORÉ, M.; LEGUBE B.; **Water Res.**, n. 33, p. 433,1999.

CAMPBELL, M.K. Bioquímica. 3. ed. Porto Alegre (RS): **Artmed**, 2000.

CANTY, E. G.; KADLER, K. E. Procollagen trafficking, processing and fibrillogenesis. **J. Cell Sci.**, v. 1, n. 118, p. 1341-53, 2005.

CHAKRABARTI, S., GUHA, S., & MAJUMDER, K. Peptídeos bioativos derivados de alimentos na saúde humana: desafios e oportunidades. **Nutrientes**, v. 10, n. 11, p.1738, 2018.

CHAN, W. C., AND WHITE, P. D. **Fmoc solid phase peptide synthesis**, Oxford University Press, 2000.

CHANG-FENG, C.; FA-YUAN, H.; BIN W.; ZHONG-RUI, L.; HONG-YU, L. Influence of Amino Acid Compositions and Peptide Profiles on Antioxidant Capacities of Two Protein Hydrolysates from Skipjack Tuna (*Katsuwonus pelamis*) Dark Muscle. **Marine Drugs**, v. 13, p. 2580-2601, 2015.

CHANG-FENG, C.; ZI-HAO, C.; BIN, W.; FA-YUAN, H.; ZHONG-RUI, L.; BIN, Z. Antioxidant and Functional Properties of Collagen Hydrolysates from Spanish Mackerel Skin as Influenced by Average Molecular Weight. **Molecules**, n.19, p.11211-11230, 2014.

CHAUDRY, Z. F.; ROCHA, J. L.; PLEPIS, A. M. G.; ROSSI, M.; GOISSIS, G. Preparação e Caracterização de Colágeno Aniônico por Hidrólise Seletiva de Grupos Carboxamida Internos. **Polímeros: Ciência e Tecnologia**, p. 41-46, 1997.

CHEN, H. M.; MURAMOTO, K.; YAMAUCHI, F. Structural analysis of antioxidative peptides from soybean b-conglycinin. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 43, p. 574–578, 1995.

CHENG, A.Y.; FANTUS, I. G. Oral antihyperglycemic therapy for type 2 diabetes mellitus. **Cmaj**, v. 172. n. 2, p. 213-226, 2005.

CHI, C. F.; WANG, B.; DENG, Y.Y.; WANG, Y.M.; DENG, S.G.; MA, J.Y. Isolation and characterization of three antioxidant pentapeptides from protein hydrolysate of monkfish (*Lophius litulon*) muscle. **Food Research International**, v. 55, 222–228, 2014.

CHIASSON, J. L.; JOSSE, R. G.; GOMIS, R.; HANEFELD, M.; KARASIK, A.; LAAKSO, M. Acarbose for prevention of type 2 diabetes mellitus: the STOP-NIDDM randomized trial. *Lancet*, v. 359, n. 9323, p. 2072-2077, 2002.

CHIBA, S. Molecular mechanism in alpha-glucosidase and glucoamylase. *Biosci. Biotechnol Biochem*, v.61, n.8, p. 1233-1239. 1997.

CICERO, A. F. G., FOGACCI, F., COLLETTI, A.; Potential role of bioactive peptides in prevention and treatment of chronic diseases: a narrative review. **British Journal of Pharmacology**, v. 174, p. 1378–1394, 2017.

CROWE, K. M.; & FRANCIS, C. Position of the Academy of Nutrition and Dietetics: Functional Foods. **Journal of the academy of nutrition and dietetics**, p. 1096-1103, 2013.

CUMBY, N.; ZHONG, Y.; NACZK, M.; SHAHIDI, F. Antioxidant activity and water-holding capacity of canola protein hydrolysates. **Food chemistry**, v.109, n.1, p.144-148, 2008.

DAMODARAN, S.; PARKIN, K.L.; FENNEMA, O.R. **Química de alimentos de Fennema**. 5.ed.: Artmed, 2019.

DAMODARAN, S.; PARKIN, K.L.; FENNEMA, O.R. **Química de alimentos de Fennema**. 4.ed. São Paulo: Artmed, 2010.

FARIA, M.; COSTA, E.L.; GONTIJO, J. A. R.; NETTO, F.M. Evaluation of the hypotensive potential of bovine and porcine collagen hydrolysates. **Journal Med. Food.**, v.11, n.3, p.560-567, 2008.

FERREIRA, A. L. A.; MATSUBARA, L. S. Radicais livres: conceitos, doenças relacionadas, sistema de defesa e estresse oxidativo. **Revista de Associação Médica Brasileira**, v. 43, n. 1, p. 61-68, 1997.

FERREIRA, A. M.; GENTILE, P.; CHIONO, V.; CIARDELLI, G. Collagen for bone tissue regeneration. **Acta Biomaterialia**, v.8, p. 3191-3200, 2012.

FISHER, G.J.; VARANI, J.; VOORHEES, J.J. Looking older: fibroblast collapse and therapeutic implications. **Arch Dermatol Res.**, v.144, n.5, p.666-72, 2008.

FU, Z.; GILBERT, E.R.; LIU, D. Regulation of insulin synthesis and secretion and pancreatic Betacell dysfunction in diabetes. **Current Diabetes Reviews**, v. 9, n. 1, p. 25-53, 2013.

GALLEGO, M.; MORA, L.; HAYES, M.; REIG, M.; TOLDRÁ, F. Effect of cooking and in vitro digestion on the antioxidant activity of dry-cured ham by-products. **Food Research International**, v. 97, p. 296–306, 2017.

GANEM, B. Inhibitors of Carbohydrate-Processing Enzymes: Design and Synthesis of Sugar-shaped Heterocycles. *Acc Chem Res.*, v.29, p. 340-347, 1996.

GARTNER, L. P., HIATT, J. L. **Tratado de Histologia em cores**. Elsevier Editora Ltda. 3ª Edição. p.79-80, 2007.

GASPAR-PINTILIESCU, A.; OANCEA, A.; COTARLET, M.; VASILE, A. M. BAHRIM G. E.; SHAPOSHNIKOV, S.; CRACIUNESCU, O.; OPRITA, E. I. Angiotensin-converting enzyme inhibition, antioxidant activity and cytotoxicity of bioactive peptides from fermented bovine colostrum. **International Journal of Dairy Technology**, v. 70, p. 1-9, 2019.

GOISSIS, A.P.A. **Análise estrutural do colágeno I. Correlação estrutural: Atividade biológica**. Dissertação Mestrado – Escola de Engenharia de São Carlos/Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto/ Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2008.

GOMÉZ-GUILLÉN, M.C.; FERNANDÉZ-DÍAZ, M.D.; ULMO, N.; LIZARBE, M.A.; MONTERO, P. Structural and physical properties of gelatina extracted from different marine species: a comparative study. **Food Hydrocolloids**, n.16, p.25-34, 2002.

HALIM, N.R.A.; YUSOF, H. M.; SARBON, N. M. Functional and bioactive properties of fish protein hydrolysates and peptides: A comprehensive review. **Trends in Food Science & Technology**, v. 51, p. 24-33, 2016.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J.M.C. Role of free radicals and catalytic metal ions in human disease: an overview. **Methods Enzymol**, n.186, p. 1-85, 1990.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J. M. C.; CROSS, C. E.; **J. Lab. Clin. Med.**, p.119-598, 1992.

HALLIWELL, B.; AESCHBACH, R.; LOLIGER, J.; AROUMA, O. I. The characterization of antioxidants. **Food Chem.Toxicol.**, n.33, p. 601-617,1995.

HALLIWELL, B.; **The Lancet**, n. 355, p.1179, 2000.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J. **Free Radicals in Biology and Medicine**. 3rd Ed, Oxford: Oxford University Press, 2007.

HASHIM, P., MOHD RIDZWAN, M. S., BAKAR, J., MAT HASHIM, D. Collagen in food and beverage industries. **International Food Research Journal**, v. 22, n. 1, p. 1-8, 2015.

HERNÁNDEZ-LEDESMA, B.; QUIRÓS, A.; AMIGO, L.; RECIO, I. Identification of bioactive peptides after digestion of human milk and infant formula with pepsin and pancreatin. **International Dairy Journal**, v. 17, p. 42–49., 2007.

HOMAYOUNI-TABRIZI, M.; ASOODEH, A.; SOLTANI, M. Cytotoxic and antioxidant capacity of camel milk peptides: Effects of isolated peptide on superoxide dismutase and catalase gene expression. **Journal of Food and Drug Analysis**, v. 25 n. 3, p. 567–575, 2017.

HORN, M. M.; MARTINS, V. C. A.; PLEPIS, A. M. G; Interaction of anionic collagen with chitosan: Effect on thermal and morphological characteristics. **Carbohydrate Polymers**, v.77, p.239-243, 2009.

HUSAIN, S. R.; CILLARD, J.; CILLARD, P. Hydroxyl radical scavenging activity of flavonoids. **Phytochemistry**, n. 26, p. 2489-2491, 1987.

IDF, FEDERAÇÃO INTERNACIONAL DIABETES. Atlas de la diabetes de la FID. 9ªEdição, 2019. Disponível em :<https://www.diabetesatlas.org/upload/resources/material/20200121_122310_2408-IDF-Regional-Factsheets-SP-final_SACA-210120.pdf> Acesso em 08 de agosto de 2020.

IDF, International Diabetes Federation, Atlas IDF 2017- Diabetes no Brasil. Número de pessoas com diabetes no mundo e por região em 2017 e em 2045. Disponível em: <<https://www.diabetes.org.br/profissionais/images/2018/poster-atlas-idf-2017.pdf>> Acesso em: 06 de junho de 2020.

JANKANGRAM, W.; CHOOLUCK, S.; POMTHONG, B. Comparison of the properties of collagen extracted from dried jellyfish and dried squid. African. **Journal of Biotechnology**, v.15, n.16, p. 642-648, 2016.

JEMIL, I., MORA, L., NASRI, R., ABDELHEDI, O., ARISTOY, M.-C., HAJJI, M., TOLDRÁ, F. A peptidomic approach for the identification of antioxidant and ACE-inhibitory peptides in sardinelle protein hydrolysates fermented by *Bacillus subtilis* A26 and *Bacillus amyloliquefaciens* An6. **Food Research International**, v. 89, p. 347–358, 2016.

JENDRICKE, P.; CENTNER, C.; ZDZIEBLIK, D.; GOLLHOFER, A.; KÖNIG, D. Specific Collagen Peptides in Combination with Resistance Training Improve Body Composition and Regional Muscle Strength in Premenopausal Women: A Randomized Controlled Trial. **Nutrients**, v.11, p. 892, 2019.

KIERSZENBAUM, A. L. **Histologia e Biologia Celular**: uma introdução à patologia. 2ª Edição, Rio de Janeiro: Elsevier, p. 112-115, 2008.

KIM, S. E.; MENDIS, E. Bioactive compounds from marine processing byproducts e a review. **Food Research International**, v. 39, p.383-393, 2006.

KIM, S. Isolation and characterization of antioxidative peptides from gelatin hydrolysate of Alaska pollack skin. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 49, n. 4, p. 1984-1989, 2001.

KITTS, D. D.; WEILER, K. Bioactive Proteins and Peptides from Food Sources. Applications of Bioprocesses used in Isolation and Recovery. **Current Pharmaceutical Design**, v. 9, n. 16, p. 1309, 2003.

KÖNIG, D.; OESSER, S.; SCHARLA, S.; ZDZIEBLIK, D.; GOLLHOFER, A. Specific Collagen Peptides Improve Bone Mineral Density and Bone Markers in Postmenopausal Women-ARandomized Controlled Study. **Nutrients**. v.10, n.1, p. 2-11, 2018.

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

LAFARGA, T., ÁLVAREZ, C., HAYES, M. Bioactive peptides derived from bovine and porcine co-products: A review. **Journal of Food Biochemistry**, v.41, n.6, 2017.

LEE, C. H.; SINGLA, A.; LEE, Y. Review. Biomedical applications of collagen. **International Journal of Pharmaceuticals**. n. 221, p.1-22, 2001.

LEE, S. K.; POSTHAUER, M. E.; DORNER, B.; REDOVIAN, V.; MALONEY, M. J. Adv. Skin Wound Care: **J. Preventing Healing**, v. 19, p. 92–96, 2006.

LEE, S. K.; POSTHAUER, M. E.; DORNER, B.; REDOVIAN, V.; MALONEY, M. J. Adv. Skin Wound Care: **J. Preventing Healing**, v. 19, p. 92–96, 2006.

LEHNINGER, A.L. **Princípios de bioquímica**. 2. ed. São Paulo (SP): Sarvier, 1995.

LI, Y.; ZHANG, H.; ZHANG, S.; YAN, X., SHAO, Y.; JIANG, Y. Egg White peptide KPHAEVVLIR promotes skin fibroblasts migration and mice skin wound healing by stimulating cell membrane Hsp90 α secretion. **Process Biochemistry**, v. 92, p. 2936, 2020.

LI, Z.; WANG, B.; ZHANG, Q.; QU, Y.; XU, H.; LI, G. Preparation and antioxidant property of extract and semipurified fractions of *Caulerpa racemosa*. **J. Appl. Phycol.**, n.24, p. 1527–1536, 2012.

LIN, L.; LI, B. F. Radical scavenging properties of proteinhydrolysates from Jumbo flying squid (*Dosidicus eschrichtii* Steenstrup) skin gelatin. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, n. 86, p. 2290–2295, 2006.

LINDEN, G.; LORIENT, D. **New ingredients in food processing: biochemistry and agriculture**. Boca Raton (FL): CRC Press; 2000.

LIU, C.; PENG, D.; YANG, J.; LI, Y.; LI, J. **Anti-oxidative and anti-aging activities of collagen hydrolysate**. III International Conference On Biomedical Engineering And Informatics (BMEI); Yantai., p. 1981-84, 2010.

MACHADO, A.; LIRIA, C. W.; PROTI, P. B.; REMUZGO, C.; MIRANDA, M. T. M. Síntese Química e enzimática de peptídeos: Princípios básicos e aplicações. **Quim. Nova.**, v.27, n.5, p.781-785, 2004.

MACHADO, L. P.; KOHAYAGAWA, A.; SAITO, M. E.; SILVEIRA, V.F. da; YONEZAWA, L. A. Lesão oxidativa eritrocitária e mecanismos antioxidantes de

interesse em Medicina Veterinária. **Revista de Ciências Agroveterinárias**, v. 8, n. 1, p. 84-94, 2009.

MAESTRI, E., MARMIROLI, M., & MARMIROLI, N. Bioactive peptides in plant-derived foodstuffs. **Journal of Proteomics**, v.147, p. 140–155, 2016.

MALTAIS, M.L.; DESROCHES, J.; DONNE, I.J. Changes in muscle mass and strength after enopause. **J Musculoskelet Neuronal Interact.**,v. 9, n.4,p. 186–97, 2009.

MARZZOCO, A.; TORRES, B. B.; Bioquímica básica. 4. Ed. – [reimpr.]. – Rio de Janeiro: **Guanabara Koogan**, 2016.

MATSUI, T.; MATSUMOTO. α -Glucosidase Inhibitory Activity of Some Sri Lanka Plant Extracts One of Which, Cassia Auriculata, Exerts a Strong Antihyperglycemic Effects in Rats Comparable to the Therapeutic Drug Acarbose. **J. Agric. Food Chem.**, v. 52, n. 9, p. 2541-2545, 2004.

MELO, E. B.; GOMES, A. S.; CARVALHO, I. α - and β -Glucosidase inhibitors: chemical structure and biological activity. **Tetrahedron**, v.62, p.10277-10302, 2006.

MOHANTY, D.P. Milk derived bioactive peptides and their impact on human health – A review. **Saudi Journal of Biological Sciences**. v. 23, p. 577–583, 2016.

MORETTI, B.R. **Efeito da suplementação do leite com proteína de diferentes fontes (soro de leite, soja e colágeno) e da composição de cultura láctica em iogurtes**. [dissertação de mestrado]. São José do Rio Preto (SP): Universidade Estadual Paulista; 2009.

MOSKOWITZ, R.W. Role of collagen hydrolysate in bone and joint disease. **Semin Arthritis Rheum.**, v.3, n.2, p.87-89, 2000.

NEVES, R. A. M.; MIRA, N. V. M.; LANFER.; MARQUEZ, U. M, L. **Caracterização de Hidrolisados Enzimáticos de Pescado**. Ciênc. Tecnol. Aliment., Campinas, v. 24, n.1, p. 101-108, 2004.

NGO, D. H.; VO, T. S.; RYU, B.; KIM, S. K. Angiotensin-I-converting enzyme (ACE) inhibitory peptides from Pacific cod skin gelatin using ultrafiltration membranes. **Process Biochemistry**, v. 51, n.10, p.1622-1628, 2016.

NIELSEN, P. M.; PETERSEN, D.; DAMBMANN, C. Improved method for determining food protein degree of hydrolysis. **Journal of Chemistry and Toxicology**, v.66, n.5, p. 42-646, 2001.

NUÑEZ, S. M.; CÁRDENAS, C.; PINTO, M.; VALENCIA, P.; CATALDO, P.; GUZMÁN, F.; ALMONACID, S. Bovine skin gelatin hydrolysates as potential substitutes for polyphosphates: The role of degree of hydrolysis and pH on water-holding capacity. **Journal of Food Science**, 2020.

OERTZEN-HAGEMANN, V.; KIRMSE, M.; EGGERS, B.; PFEIFFER, K.; MARCUS, K.; MARÉES, M.; PLATEN, P. Effects of 12 Weeks of Hypertrophy Resistance Exercise Training Combined with Collagen Peptide Supplementation on the Skeletal Muscle Proteome in Recreationally Active Men. **Nutrients**, v.11, n.1072, p. 2-18, 2019.

OESSER, S.; ADAM, M.; BABEL, W.; SEIFERT, J. Oral administration of (14)C labeled gelatin hydrolysate leads to an accumulation of radioactivity in cartilage of mice (C57/BL). **J. Nutr.** v.129, p.1891–1895, 1999.

OFFENGENDEN, M.; CHAKRABARTI, S.; WU, J. Chicken collagen hydrolysates differentially mediate anti-inflammatory activity and type I collagen synthesis on human dermal fibroblasts. **Food Science and Human Wellness**, v. 7, n. 2, p.138-147, 2018.

OHARA, A.; CASON, V. G.; NISHIDE, T. G.; MATOS, F. M.; CASTRO, R. J. S. Improving the antioxidant and antidiabetic properties of common bean proteins by enzymatic hydrolysis using a blend of proteases. **Biocatalysis and Biotransformation**, p. 1-10, 2020.

OLIVEIRA, M. C M. **Caracterização do Extrato Aquoso de Alpinista (Phalaris canariensis L.) e Avaliação dos efeitos antioxidantes e Hipoglicemiantes.** Dissertação. Faculdade de Engenharia de Alimentos da Universidade Estadual de Campinas. Campinas, SP. 2015.

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

PEDREIRA, C.M.S. **Como as fibras de colágeno influenciam na maciez da carne**, 2012. Disponível em: < <http://www.beefpoint.com.br/radares-tecnicos/qualidade-da-carne/comoas-fibras-de-colageno-influenciam-na-maciez-da-carne-4983>>. Acesso em: 15 de Abril de 2020.

PERFETTI, R.; BARNETT, P. S.; MATHUR R.; EGAN, J. M. Novel therapeutic strategies for the treatment of type 2 diabetes. **Diabetes Metabolism Rev.**, v. 14, n. 3, p. 207-225, 1998.

PIETTA, P. G. Flavonoids as antioxidants. **J. Nat. Prod.**, n. 63, p.1035-1042, 2000.

PORFÍRIO, E.; FANARO, G. B. Suplementação com colágeno como terapia complementar na prevenção e tratamento de osteoporose e osteoartrite: uma revisão sistemática. **Revista Brasileira Geriatr. Gerontol.**, Rio de Janeiro, v.19, n.1, p.153-164, 2016.

POWELL, T. L.; UDENIGWE, C.C.; ALUKO, R. E. Amino acid composition and antioxidant properties of pea seed (*Pisum sativum* L.) enzymatic protein hydrolysate fractions. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 58, n. 8, p. 4712-4718, 2010.

PRESTES, R.C. Colágeno e seus derivados: Características e Aplicações em produtos cárneos. **Ciências Biológicas da Saúde**, v.15 n.1, p.65-74, 2013.

QIAO, M.; TU, M.; WANG, Z.; MAO, F.; CHEN, H.; QIN, L.; DU, M. Identification and antithrombotic activity of peptides from blue mussel (*Mytilus edulis*) protein. **International journal of molecular sciences**, v.19, n.1, p. 138, 2018.

RABIEI, S.; REZAEI, M.; ASGHARZADE, S.; NIKOO, M.; RAFIEIA-KOPAI, M. Antioxidant and cytotoxic properties of protein hydrolysates obtained from enzymatic hydrolysis of Klunzinger's mullet (*Liza klunzingeri*) muscle. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 55, 2019.

RIZZELLO, C. G., LORUSSO, A., RUSSO, V., PINTO, D., MARZANI, B., & GOBBETTI, M. Improving the antioxidant properties of quinoa flour through fermentation with selected autochthonous lactic acid bacteria. **International Journal of Food Microbiology**, v. 241, p. 252–261, 2017.

SACHINDRA, N. M., & BHASKAR, N. In vitro antioxidant activity of liquor from fermented shrimp biowaste. **Bioresource Technology**, v. 99, n. 18, p. 9013–9016, 2008.

SÁNCHEZ, A.; VÁZQUEZ, A. Bioactive peptides: A review. **Food Quality and Safety**, v.1, n.1, p. 29–46, 2017.

SANGSAWAD, P.; ROYTRAKUL, S.; YONGSAWATDIGUL, J. Angiotensin converting enzyme (ACE) inhibitory peptides derived from the simulated in vitro gastrointestinal digestion of cooked chicken breast. **Journal of Functional Foods**, v. 29, p. 77-83, 2017.

SANTOS, M.H; SILVA, R.M.; DUMONT, V.C.; NEVES, J.S.; MANSUR, H.S.; HENEINE, L.G.D. Extraction and characterization of highly purified collagen from bovine pericardium for potential bioengineering applications. **Materials Science & Engineering C.**, v. 33, n. 2, p. 790–800, 2013.

SARMADI, B. H., & ISMAIL, A. Antioxidative peptides from food proteins: A review. **Peptides**, v. 31, n.10, p.1949–1956, 2010.

SATO, K. Review: The presence of food-derived collagen peptides in human body-structure and biological activity. **Food Funct.**, v. 8, p. 4325–4330, 2017.

SBD, (SOCIEDADE BRASILEIRA DE DIABETES). **Diretrizes da Sociedade Brasileira de Diabetes**, 2016 Disponível em: <http://www.diabetes.org.br/sbdonline/images/docs/DIRETRIZES-SBD-2015-2016.pdf>.> Acesso em 06 de Agosto de 2020.

SBD, SOCIEDADE BRASILEIRA DE DIABETES. **Diretrizes Da Sociedade Brasileira De Diabetes 2019-2020. Epidemiologia e impacto global do diabetes mellitus**. Clannad, p. 12, 2020. Disponível em: <<https://www.diabetes.org.br/profissionais/images/DIRETRIZES-COMPLETA-2019-2020.pdf>> Acesso em 06 de agosto de 2020.

SBD, SOCIEDADE BRASILEIRA DE DIABETES. **Sintomas de Diabetes**. Disponível em: <<https://www.diabetes.org.br/publico/sintomas-de-diabetes>> Acesso em 07 de agosto de 2020.

SBD, SOCIEDADE BRASILEIRA DE DIABETES. **Tipos de diabetes**. Disponível em:<https://www.diabetes.org.br/publico/diabetes/tipos-de-diabetes?gclid=CjwKCAjw1K75BRAEEiwAd41h1EtjFFjFJ1BEdoVG5bJYB3TZRAe mqqtmyNhVCrjX2aTiKbDXZxeohoC0PwQAvD_BwE> Acesso em 06 de agosto de 2020.

SBEM, SOCIEDADE BRASILEIRA DE ENDOCRINOLOGIA E METABOLOGIA. **O que é diabetes?** Disponível em:<<https://www.endocrino.org.br/o-que-e-diabetes/>> Acesso em 06 de agosto de 2020.

SCHMIDT, C. G.; SALAS-MELLADO, M. Influência da ação das enzimas alcalase e flavourzyme no grau de hidrólise das proteínas de carne de frango. **Química Nova**, v. 32, n. 5, p. 1144-1150, 2009.

SGARBIERI, V. C.; PACHECO, M. T. B.; GIBRIN, N. F.; OLIVEIRA, D. A. G.; SILVA, M. E. C. Importance of Diet, Genetic and Lifestyle on Human Aging, Health and Cognition. **Book Publisher Internacional**, 2020.

SHAZLY, A. B.; UM, H.; LIU, Z.; EL-AZIZ, M. A.; ZENG, M.; QIN, F.; ZHANG, S.; HE, Z.; CHEN, J. Release of antioxidant peptides from buffalo and bovine caseins: Influence of proteases on antioxidant capacities. **Food chemistry**, v. 274, p. 261-267, 2019.

SHIGEMURA, Y.; IWAI, K.; MORIMATSU, F.; IWAMOTO, T.; MORI, T.; ODA, C.; TAIRA, T.; PARK, E. Y.; NAKAMURA, K.; SATO, Y. **J. Agric. Food Chem.**, v. 57, p. 444–449, 2009.

SIDDIQUI, Y.D.; ARIEF, E.M.; YUSOFF, A.; HAMID, S.S.A.; NORANI, T.Y.; ABDULLAH, M.Y.S. Extraction, Purification and Physical Characterization of Collagen from Body wall of Sea cucumber *Bohadschia bivitatta*. **Health and the Environment Journal**, v.4, n. 2, p. 53-65, 2013.

SIEBRECHT, S.; HAUSMANN, S.; KNEFÉLI, H.C. **Amazing Collagen Peptides**. Mag. Sabine Sauerzapf, Vienna, Austria, v.1, n.1, p.11-14, 2018.

SILVA, E. V.C. **Otimização das condições de extração da gelatina de pele de peixes amazônicos por diferentes métodos**. Tese de Doutorado. Universidade Federal do Pará, p. 19-20, 2016.

SILVA, M. E.; SILVA, W. M.; MENDONÇA, D. S.; BARBOSA, D. A. M.; SILVA, L. S. L.; RODRIGUES, T.O. Promoção da homeostase glicêmica em indivíduos diabéticos através do exercício físico: Uma revisão narrativa. **Brazilian Journal of Development**. v. 6, n. 7, p. 44576-44585, 2020.

SILVA, T. F.; PENNA, A. L. B. Colágeno: Características químicas e propriedades funcionais. **Rev Inst Adolfo Lutz**. São Paulo, v. 71, n. 3, p. 530-9, 2012.

SIM, L.; QUEZADA-CALVILLO, R.; STERCHI, E. E.; NICHOLS, B. L.; ROSE, D. R. Human intestinal maltase-glucoamylase: Crystal structure of the N-terminal

catalytic subunit and basis of inhibition and substrate specificity. **J Mol Biol.**, v. 375, n. 3, p. 782-792, 2008.

SIONKOWSKA, A. The influence of UV light on collagen/poly(ethylene glycol) blends. **Polymer Degredation and Stability**. v. 91 n. 2, p. 305-312, 2006.

SONG, H.; ZHANG, S.; ZHANG, L.; LI, B. Effect of Orally Administered Collagen Peptides from Bovine Bone on Skin Aging in Chronologically Aged Mice. **Nutrients**, v.9, n.11, p.1209, 2017.

SUGIHARA, F.; INOUE, N.; KOIZUMI, S.; YOSHIMOTO, T.; OYAMA, H.; Therapeutic or Preventive agent for Diabetes. **Pharmacol. Ther.**, v. 43, p. 1323–1328, 2015.

SUN, L.; ZHANG, Y.; ZHUANG, Y. Antiphotaging effect and purification of an antioxidant peptide from tilapia (*Oreochromis niloticus*) gelatin peptides. **Journal of Functional Foods**, v.5, n.1, p.154-162, 2013.

TOLDRÁ, F., REIG, M., ARISTOY, M.-C., & MORA, L. Generation of bioactive peptides during food processing. **Food Chemistry**, v.267, p. 395–404, 2017.

USDA - United States Department of Agriculture Foreign Agricultural Service, **Livestock and Poultry: World Markets and Trade**. Disponível em: <https://apps.fas.usda.gov/psdonline/circulars/livestock_poultry.pdf> com acesso em 27 de julho de 2020.

WALRAND, S.; CHIOTELLI, E.; NOIRT, F.; MWEWA, S.; LASSEL, T. Consumption of a functional fermented milk containing collagen hydrolysate improves the concentration of collagen-specific amino acids in plasma. **J. Agric Food Chem.**, v. 56 n.16, p.7790–5, 2008.

WANG, L.; JIANG, Y.; WANG, X.; ZHOU, J.; CUI, H.; XU, W.; HE, YUANQING; MA, H.; GAO, R. 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, Y.; ZHU, F.; HAN, F.; WANG, H. Purification and characterization of antioxidative peptides from salmon protamine hydrolysate. **Journal of food biochemistry**, v.32, n.5, p. 654-671, 2008.

WHITECOMB, D. C.; LOWE, M. E. Human pancreatic digestive enzymes. **Dig Dis Sci.**, v. 52, n.1, p.1-17, 2007.

WHO (1990). **Diet, Nutrition, and the Prevention of Chronic Diseases**. Disponível em: http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/42665/1/WHO_TRS_916.pdf Acesso em 10 de julho de 2020.

WHO (WORLD HEALTH ORGANIZATION). **Noncommunicable diseases progress monitor**. Geneva: World Health Organization, 2017.

WOLF, K.L. **Propriedades físico-químicas e mecânicas de biofilmes elaborados a partir de fibra e pó de colágeno** [dissertação de mestrado]. São José do Rio Preto (SP): Universidade Estadual Paulista; 2007.

YU, F.; HE, K.; DONG, X.; ZHANG, Z.; WANG, F.; TANG, Y.; CHEN, Y.; DING, G. (2020). Immunomodulatory activity of low molecular-weight peptides from *Nibeia japonica* skin in cyclophosphamide-induced immuno suppressed mice. **Journal of Functional Foods**, v.68, 2020.

YU, Z.; YIN, Y.; ZHAO, W.; LIU, J.; CHEN, F. Anti-diabetic activity peptides from albumin against α -glucosidase and α -amylase. **Food Chemistry**, v. 135, p. 2078–2085, 2012.

YUAN, G.; LI, W.; PAN, Y.; WANG, C.; CHEN, H. Shrimp shell wastes: Optimization of peptide hydrolysis and peptide inhibition of α -amylase. **Food Bioscience**, v. 25, p. 52-60, 2018.

ZAGUE, V.; AMARAL, J. B.; REZENDE TEIXEIRA, P.; OLIVEIRA NIERO, E. L.; LAUAND, C.; MACHADO-SANTELLI, G. M. Collagen peptides modulate the metabolism of extracellular matrix by human dermal fibroblasts derived from sun-protected and sun-exposed body sites. **Cell biology international**, v. 42, n. 1, p. 95-104, 2018.

ZAGUE, V.; FREITAS, V.; ROSA, M.C.; CASTRO, G.A.; JAEGER, R.G.; MACHADO-SANTELLI, G.M. Collagen hydrolysate intake increases skin collagen expression and suppresses matrix metalloproteinase 2 activity. **J. Med Food.**, v.14, n.6, p. 618-2, 2011.

ZAMBROWICZ, A.; ECKERT, E.; POKORA, M.; BOBAK, Ł.; BROWSKA, A.; SZOŁTYSIK, M.; TRZISZKA, T.; CHRZANOWSKA, J. Antioxidant and antidiabetic activities of peptides isolated from a hydrolysate of an egg-yolk protein by-product

prepared with a proteinase from Asian pumpkin (*Cucurbita ficifolia*). **Journal The Royal Society of Chemistry**, v. 5, p. 10460-10467, 2015.

ZEUGOLIS, D.I.; RAGHUNATH, M. Collagen: Materials Analysis and Implant Uses. In: P. Ducheyne, K. Healy, D. Hutmacher, D. Grainger, C. Kirkpatrick. Ed. Elsevier. **Comprehensive Biomaterials**, p. 261-278, 2011.

ZHANG, M.; MU, T. H. Identification and characterization of antioxidant peptides from sweet potato protein hydrolysates by Alcalase under high hydrostatic pressure. **Innovative Food Science & Emerging Technologies**, v.43, n. August, p. 92-101, 2017.

ZHANG, R.; CHEN, J.; JIANG, X.; YIN, L.; ZHANG, X. Antioxidant and hypoglycaemic effects of tilapia skin collagen peptide in mice. **International Journal of Food Science and Technology**, v. 51, p. 2157–2163, 2016.

ZHANG, SHUYU; LIANG, RONG; ZHAO, YU; ZHANG, SIMIN; LIN, SONGYI. Immunomodulatory Activity Improvement of Pine Nut Peptides by a Pulsed Electric Field and Their Structure–Activity Relationships. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, p. 1-41, 2019.

ZHANG, Y.; OLSEN, K.; GROSSI, A.; OTTE, J. Effect of pretreatment on enzymatic hydrolysis of bovine collagen and formation of ACE-inhibitory peptides. **Food Chemistry**, v.141 p. 2343–2354, 2013.

ZIMMET, P.; ALBERTI, K. G.; SHAW, J. Global and societal Implications of the diabetes epidemic. **Nature**, v.13, n.414, p. 782-787, 2001.

ZOU, Y.; WANG, W.; LI, Q.; CHEN, Y.; ZHENG, D.; ZHOU, Y.; ZHANG, M.; ZHAO, T.; MAO, G.; FENG, W.; WU, X.; YANG, L. Physicochemical, functional properties and antioxidant activities of porcine cerebral hydrolysate peptides produced by ultrasound processing. **Process Biochemistry**, v. 51, p. 431–443, 2016.

ZDZIEBLIK, D.; OESSER, S.; GOLLHOFER, A.; KÖNIG, D. Improvement of activity-related knee joint discomfort following supplementation of specific collagen peptides. **Applied Physiology, Nutrition, and Metabolism**, v.42, n.6, p. 588-595, 2017.

CAPÍTULO 2

Artigo para submissão na Revista Science Food

ATIVIDADE HIPOGLICEMIANTE E ANTIOXIDANTE DE PEPTÍDEOS DE COLÁGENO HIDROLISADO DE DIFERENTES ESPÉCIES

Resumo

Os pesquisadores têm dado atenção especial aos peptídeos derivados de hidrolisados de proteínas devido à sua capacidade de modular algumas atividades biológicas diferentes da proteína nativa. Os peptídeos de colágeno têm uma função importante no envelhecimento celular, entretanto, suas propriedades antioxidantes bioativas e hipoglicemiantes não foram totalmente exploradas. Este estudo teve como objetivo caracterizar e avaliar o potencial biológico in vitro de hidrolisados bovinos (BH), hidrolisados de peixe (FH) e hidrolisados suínos (PH) quanto às suas atividades antioxidante e hipoglicêmica. Todas as amostras apresentaram percentuais acima de 90% de conteúdo proteico, com elevados teores de aminoácidos (glicina, prolina e hidroxiprolina), responsáveis pela estrutura específica do colágeno. A amostra de BH apresentou maior grau de hidrólise (DH) (8,7%) e maior percentual de peptídeos menores que 2 kDa (74,1%). Todos os colágenos analisados in vitro apresentaram inibição das enzimas pancreáticas (α -amilase e α -glicosidase), com potencial para prevenir diabetes mellitus. A amostra de PH apresentou maiores atividades antioxidantes medidas pelos métodos ORAC ($67,08 \pm 4,23 \mu\text{mol Trolox Eq./g}$) e eliminação do radical ABTS ($65,69 \pm 3,53 \mu\text{mol Trolox Eq./g}$). O maior potencial antioxidante do PH pode estar relacionado à maior quantidade de tirosina (Tyr), que é um aminoácido livre. A primeira análise de proteção de DNA foi relacionada a peptídeos de colágeno hidrolisados, e a amostra de FH apresentou ação antioxidante protetora para DNA superenrolado tanto na presença (39,51%) quanto na ausência (96,36%) de AAPH (reagente 2,2'-azobis (2-amidinopropano) .Os resultados confirmaram que a fonte de colágeno nativo reflete na

bioatividade dos peptídeos de colágeno hidrolisados, provavelmente devido à sua composição aminoacídica.

Palavras-chave: Atividade antioxidante; Atividade hipoglicêmica; Proteção de DNA; Peptídeos Bioativos

1. Introdução

O mundo começou a envelhecer mais nos últimos anos, uma vez que países desenvolvidos e em desenvolvimento passaram a apresentar redução das taxas de mortalidade e fecundidade, bem como aumento da expectativa de vida da população. Com o aumento da longevidade, as doenças crônicas associadas ao envelhecimento assumiram uma proporção maior, junto com os custos hospitalares com essa população (Martin et al., 2005). Uma das consequências do envelhecimento é a degradação ou redução do colágeno no corpo. O colágeno é a principal proteína do tecido conjuntivo e é importante quanto à integridade estrutural e adesão à matriz extracelular. Nas últimas décadas, o colágeno tornou-se cada vez mais importante no mercado, devido às suas inúmeras aplicações. Estudos mostram que a ingestão de peptídeos de colágeno hidrolisados pode favorecer a regeneração e recuperação de lesões, aumentar a densidade óssea, bem como combater doenças relacionadas à idade, como tendinite, bursite, osteoporose, osteoartrite e tensão muscular (Bello e Oesser, 2006; Moskowitz , 2000; Porfírio e Fanaro, 2016).

As propriedades bioativas dos peptídeos de colágeno ainda são pouco exploradas quando se consideram as complicações do envelhecimento, que incluem estresse oxidativo, dano ao DNA e condição hiperglicêmica (observada no Diabetes mellitus tipo II - DM2). Afirma-se que a prevenção do estresse oxidativo pode auxiliar no tratamento do DM 2, pelo combate às espécies reativas de oxigênio (ROS). Além disso, alguns peptídeos,

como a acarbose, impedem o intestino de digerir todos os carboidratos consumidos, inibindo enzimas importantes envolvidas no metabolismo da glicose. Os peptídeos inibem as enzimas α -amilase e α -glucosidase, reduzindo a taxa de absorção dos monossacarídeos e evitando o aumento da glicose pós-prandial (Perfetti et al., 1998).

Os peptídeos são definidos como fragmentos inativos ou criptografados na proteína nativa, que, quando liberados por proteólise enzimática, têm bioatividade promotora da saúde (Chakrabarti et al., 2014; Sgarbieri et al., 2020). O colágeno hidrolisado pode ser obtido de diferentes fontes de processamento animal e representa um subproduto industrial com ampla aplicação em produtos cosméticos e alimentícios. Nos últimos anos, os hidrolisados de colágeno têm recebido cada vez mais valorização e interesse na indústria farmacêutica no que diz respeito à produção de compostos bioativos.

Apesar de sua importante ação estrutural, a bioatividade e os mecanismos de ação dos peptídeos de colágeno ainda não foram exaustivamente explorados em outras áreas, principalmente no que diz respeito à sua atividade antioxidante e hipoglicêmica. O colágeno hidrolisado pode ser obtido de diversas espécies animais, variando de acordo com suas características intrínsecas, processo de extração e condições específicas de hidrólise.

2. Materiais e Métodos

2.1. Materiais

Colágenos hidrolisados comerciais foram utilizados neste estudo, e as amostras foram nomeadas de acordo com sua origem: BH (hidrolisado bovino), FH (hidrolisado de peixe) e PH (hidrolisado suíno).

Enzimas alfa-amilases pancreáticas suínas, tipo VI-B (EC3.2.1.1-A3176-500KU); alfa-glicosidase de *Saccharomyces cerevisiae* (EC3.2.1.20-G5003-100UN); 2,2-Azobis amidinopropano (AAPH-440914); sal de sódio de fluoresceína (F6377); 2,2-azinobis (ácido 3-etilbenzotiazolina-6-sulfônico) (ABTS-10102946001); 2,2-difenil-1-picrilhidrazil (DPPH-

D9132); Ácido 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcromano; O ácido 2-carboxílico (Trolox-238813) e o ácido gálico (G7384) foram adquiridos na Sigma-Aldrich. Todos os outros produtos químicos eram analíticos ou cromatográficos.

2.2. Caracterização das amostras

2.2.1. Composição Físico-química

As amostras foram caracterizadas pelos métodos recomendados pela AOAC (AOAC International, 2012), quanto a: umidade (método n.925.45b), cinzas (método n.923.03), proteínas (método n.960.52) pelo método Kjeldahl, considerando o fator de conversão de nitrogênio para conteúdo de proteína de 5,55. O grau de hidrólise das amostras foi determinado pelo método o-ftaldeído (OPA) de acordo com (Church et al., 1983), neste caso a gelatina foi a referência de $h_{tot} = 11,1 \text{ g / Kg}$ de proteína, com h referindo-se ao número de ligações hidrolisadas (Nielsen et al., 2001).

2.2.2. Perfil de aminoácidos totais e livres

O perfil de aminoácidos total foi realizado por derivatização pré-coluna de aminoácidos liberados após hidrólise ácida (6 mol / L) sob aquecimento (110 ° C / 20 h) de acordo com White, 1986 (White et al., 1986). Os aminoácidos livres foram determinados sem realizar a etapa de hidrólise ácida (Hagen et al., 1989). A análise dos aminoácidos derivatizados foi realizada em cromatografia líquida de alta eficiência, HPLC (Shimadzu Organisation, Kyoto, Japan). Os aminoácidos foram dissolvidos em diluente e introduzidos na coluna RP-HPLC com um detector de UV a 254 nm (Shimadzu Organisation, Tóquio, Japão), equipado com uma coluna C18 Luna / Phenomenex (250 mm x 4,6 mm x, 5 µ; Phenomenex Inc., Torrence, EUA). Os aminoácidos foram quantificados por comparação usando o padrão de aminoácidos da Thermo Scientific (Rockford, IL, EUA) e o ácido DL-2-aminobutírico (Sigma-Aldrich®, St.Louis, MO, EUA) foi usado como padrão interno.

2.2.3. Perfil de Hidrofobicidade

Os hidrolisados de colágeno foram analisados por cromatografia líquida de fase reversa, de acordo com a metodologia de (Bezerra et al., 2016) com algumas modificações. A massa de 30 mg da amostra foi dissolvida em 10 mL com Eluente A (0,03% (v / v) ácido trifluoroacético (TFA) em água ultrapura) seguido de centrifugação a 3.500 g, ultrassom por 10 minutos, centrifugação a 2.700 g e filtração de membrana de politetrafluoroetileno hidrofílica (PTFE; 0,45 µm).

A coluna de fase reversa Phenomenex-Luna C18 foi usada (250 mm x 4,6 mm x, 5 µ; Phenomenex Inc., Torrence, EUA). O volume de injeção do hidrolisado de colágeno (0,3 mg / mL) foi de 50 µL, utilizando um gradiente de fase móvel estabelecido como: Eluente A e Eluente B (0,04% de TFA em acetonitrila). Depois de equilibrar a coluna com 100% de eluente A, os peptídeos foram eluídos por 40 minutos com 70% de eluente B a uma taxa de fluxo de 1 mL / min e detecção de 214 nm para ligações peptídicas e 280 nm para peptídeos aromáticos (Hexis Scientific, DR3900 , São Paulo). Com base na classificação desenvolvida por Legay et al. (1997), os cromatogramas do hidrolisado foram divididos em 3 zonas, classificando os peptídeos em: (I) baixa hidrofobicidade, cujo tempo de retenção é de até 10 minutos, com gradiente de concentração do eluente de 25%; (II) hidrofobicidade média eluída com gradiente de concentração da solução B de 40% (entre 10 e 25 minutos) e (III) hidrofobicidade elevada com gradiente de solução B acima de 40% (após 25 minutos).

O perfil de distribuição de tamanho molecular foi fornecido pela indústria e realizado por cromatografia de exclusão de tamanho de alta pressão (HPSEC) usando uma bomba isocrática (modelo 510, Waters), coluna TSK G 2000 SWXL 5µm (Ref. 0008540 Tosoh Bioscience GmbH) acoplada a TSK SWXL Coluna de guarda Guardcol 7µm (Ref. 0008543, Tosoh Bioscience GmbH), com temperatura entre 25 ° C e 40 ° C, detector de UV (214 nm) com software GPC adquir (para processamento de dados), tempo de execução 40 minutos,

volume de injeção 20 µL e taxa de fluxo 0,5 mL / min. Os padrões variaram de 1920 a 7765 Da.

2.3. Avaliação de bioatividade das amostras

2.3.1. Capacidade de absorção do radical oxigênio (ORAC)

O ensaio ORAC é baseado na capacidade de reduzir o radical peroxil (ROO •) gerado pela degradação térmica do dicloridrato de (2-2-azobis (2-amidinopropano) (AAPH) e preservação da molécula de fluoresceína pelo antioxidante fluoresceína contra a ação do radical peroxila. O decaimento da fluorescência é monitorado no modo cinético com leitura a cada minuto por duas horas em pH 7,4 (Chisté et al., 2011). A análise foi conduzida em um leitor de fluorescência de microplaca de 96 poços (software Synergy, BioTek®, Gen5) com filtros de fluorescência para excitação a 485 nm e emissão a 528 nm a 37 ° C. Uma curva Trolox padrão foi usada para expressar os valores ORAC das amostras nas concentrações de 250, 500 e 1000 ppm. Um tampão de fosfato de potássio 75 mM (pH 7,4) foi usado para diluição da curva, substrato de amostra. Cada poço da microplaca teve a adição de: 30 µL de amostra ou padrão; 60 µl de solução de fluoresceína 508,25 nM; 110 µl de solução AAPH 76 mM. As amostras e o padrão de proteção (AUCnet) foram calculados pela diferença entre a área sob a curva de decaimento de fluorescência das amostras / padrão (amostra AUC / padrão) e a área sob a curva de decaimento de fluorescência sem amostra ou adição de Trolox (AUC branco). Os resultados foram expressos em µmol equivalente de Trolox / g de amostra, em triplicado.

2.3.2. Método de eliminação do radical ABTS

O ensaio antioxidante mediu a capacidade de eliminação do radical ABTS de acordo com (Al-Duais et al., 2009). Resumidamente, solução de radical de ácido 2,2'-azino-bis (3-etilbenzotiazolina-6-sulfônico (ABTS • +) foi realizada misturando persulfato de potássio em solução aquosa (K₂S₂O₈) 140 mM e ABTS 7 mM. A mistura permaneceu no por 16 horas e teve sua absorbância ajustada para 0,7 ± 0,02 a 734 nm usando um espectrofotômetro UV-Vis antes da análise. Uma alíquota de 20 µL da amostra (500, 1000,

2500 e 5000 ppm) foi colocada em uma microplaca poço e 220 μL de solução de trabalho ABTS (Abs $0,7 \pm 0,02$) foram adicionados para reagir por 6 minutos. Após isso, a absorvância foi de 730 nm na microplaca UV-Vis Reader Synergy (BioTek®, software Gen5). Uma curva padrão Trolox em tampão fosfato 75 mM e pH 7,4 para expressar os valores de ABTS. O volume de 240 μL de tampão fosfato de sódio (75 mM, pH 7,4) foi diminuído a partir das absorvâncias das amostras e padrão pela curva analítica, os resultados finais foram expressos em μmol equivalente de Trolox / g de amostra, em triplicata.

2.3.3. Capacidade de inibir a decomposição do DNA por radicais livres

Alguns compostos têm a capacidade de proteger o DNA do estresse oxidativo causado principalmente pela presença de radicais livres no ambiente celular. Esta análise é baseada em permitir que o DNA retenha sua estrutura supercoil nativa quando exposto a agentes pró-oxidantes. Neste tipo de ensaio, a molécula de DNA do plasmídeo é inserida em um meio de reação contendo o agente oxidante e o composto antioxidante, reagindo à temperatura corporal, de modo que com a eletroforese em gel de agarose a 0,8%, as bandas de DNA "superenroladas" (estrutura original) podem ser observado, bem como o aumento da intensidade da luz ultravioleta, das bandas circulares e lineares, formadas em decorrência da quebra do DNA original (Zhang et al., 2014). O método de (Yarnpakdee et al., 2015) foi utilizado com algumas modificações para avaliar a capacidade antioxidante da solução aquosa de colágeno hidrolisado nas concentrações de 25.000, 30.000 e 50.000 ppm contra o radical peroxil, gerado pela degradação térmica ($90^\circ\text{C} / 10\text{ min}$) de AAPH através da eletroforese em gel de agarose a 0,8%. O ácido gálico foi usado como controle positivo da atividade antioxidante. O DNA de plasmídeo superenrolado foi diluído em Tris-HCl 10 mM contendo EDTA 1 mM (pH 8,0) a uma concentração de $0,125\ \mu\text{g} / \mu\text{L}$. Em um microtubo sem DNase, esses reagentes foram adicionados na seguinte ordem: 4 μL do DNA do plasmídeo superenrolado, 2 μL dos extratos aquosos de colágeno e 4 μL da solução de AAPH 30 mM preparada durante a análise. No controle positivo AAPH, o extrato

foi substituído por água. Todos os ensaios foram incubados no escuro a 37 ° C durante uma hora. A mistura de reação (10 µL) foi aplicada a um gel de agarose a 0,8% preparado com Tris-acetato EDTA (TAE) juntamente com 2 µL de tampão de carga. O tempo de execução foi de 90 minutos a 80 V seguido por 120 V durante uma hora. O gel foi corado com 1: 20.000 SYBR Safe (Thermo Scientific) adicionado ao tampão TAE e, em seguida, as bandas foram visualizadas sob luz ultravioleta no ChemiDoc Imaging System (Bio-Rad). A quantificação foi realizada no software J image. Os resultados foram expressos de acordo com a equação:

$$\% \text{Retenção da banda do DNA supercoiled} = \frac{I_{\text{amostra supercoiled}}}{I_{\text{control supercoiled}}} \times 100$$

Onde:

I_{amostra} = Intensidade da amostra na banda *supercoiled*

I_{control} = Intensidade do controle na banda *supercoiled*

2.3.4. Inibição da atividade da enzima α-amilase

A metodologia para inibir a atividade da α-amilase pancreática suína, tipo VI-B (14U / mg sólido, Sigma-Aldrich) foi baseada nos estudos de (Apostolidis et al., 2007; Ranilla et al., 2010; Yu et al. ., 2012) com algumas modificações. 250 µL de cada extrato de amostra aquoso a 0,1 e 1 mg / mL e 250 µL de solução de α-amilase (4U / mL) em tampão de fosfato de sódio 20 mM (pH 6,9) foram adicionados, ambos foram pré-incubados juntos a 37 ° C em um banho-maria por 5 minutos. Após a pré-incubação, 250 µl de uma solução de amido a 1% solúvel em tampão de fosfato de sódio 20 mM (pH 6,9) foram adicionados a cada tubo em intervalos de tempo. A reação das misturas foi então incubada novamente a 37 ° C por 10 minutos e foi finalizada com 500 µL do reagente ácido dinitrosalicílico (DNS) a 97 ° C por 15 minutos, então os tubos foram resfriados em banho de gelo até atingirem o quarto temperatura. A mistura reaccional foi então diluída com a adição de 5 ml de água destilada e a absorvância medida a 540 nm num espectrofotômetro (Varian Cary 50 UV-

Vis, Australian). Um branco comum foi preparado para os extratos e controle em duplicata e os extratos e controle em triplicata. A acarbose em solução aquosa foi usada como controle positivo para a inibição da atividade enzimática nas concentrações de 0,25, 0,5, 1 mg / mL. A porcentagem de inibição da atividade enzimática na presença da amostra e acarbose foi calculada de acordo com a equação abaixo:

$$\%Inibição = \frac{[(Ac - Ab) - (Aa/Aac - Ab)]}{(Ac - Ab)} \times 100$$

Onde:

Aa= Absorbância da amostra (extrato + enzima+ amido+ DNS+ água);

Ab = Absorbância do branco (tampão + amido + DNS + água);

Ac= Absorbância do controle (-) (tampão + enzima + amido + DNS + água);

Aac= Absorbância do controle (+) (acarbose + enzima + amido + DNS + água);

2.3.5. Inibição da atividade da enzima α -glicosidase

A atividade enzimática da α -glicosidase de *S. cerevisiae* tipo I é baseada na determinação da hidrólise contínua de pNPG em pNP. A metodologia de inibição da atividade da enzima α -glicosidase foi baseada nos estudos de (Ranilla et al., 2010; Shinde et al., 2008), com algumas modificações. Uma mistura foi pré-incubada a 37 ° C por 10 minutos e consistia em: 50 μ L de extrato de peptídeo de colágeno aquoso (0,1 e 1 mg / mL) dissolvido em tampão de fosfato de potássio 50 mM (pH 6,8), 50 μ L de potássio 50 mM tampão fosfato (pH 6,8) e 100 μ l de solução de α -glicosidase (0,4 U / ml) em tampão fosfato de potássio 50 mM (pH 6,8). Em seguida, 50 μ L do substrato (solução de p-nitrofenil- α -D-glucuronídeo 5 mM) foram adicionados e esta mistura foi incubada novamente a 37 ° C por 5 minutos. A reação foi finalizada com a adição de 100 μ L de solução de carbonato de sódio (1M) e com a adição de 700 μ L de água destilada, sendo o volume final de 1,05 mL. Imediatamente, foram transferidos dos microtubos (duplicata) para

uma placa de 96 poços, 200 µL da mistura, e a leitura foi realizada a 405 nm em espectrofotômetro de microplaca (Elx800TM BioTek, Vermont). No controle, a solução tampão foi adicionada ao invés do extrato de colágeno, e no branco, a solução tampão foi adicionada para substituir a enzima e o extrato. A acarbose em solução aquosa foi utilizada como controle positivo para a inibição da atividade enzimática nas concentrações de 500; 100; 50; 1; 0,5 e 0,25 mg / ml. Cada ensaio foi realizado em 20 segundos em duplicata e triplicata na microplaca. A porcentagem de inibição da atividade enzimática na presença da amostra e acarbose foi calculada de acordo com a equação abaixo:

$$\%Inibição = \frac{[(Ac - Ab) - (Aa/Aac - Ab)]}{(Ac - Ab)} \times 100$$

Onde:

Aa= Absorbância da amostra (extrato + enzima+ substrato + Na₂CO₃ + água);

Ab = Absorbância do branco (tampão + substrato + Na₂CO₃ + água);

Ac= Absorbância do controle (-) (tampão + enzima + substrato + Na₂CO₃ + água);

Aac= Absorbância do controle (+) (acarbose + enzima + substrato + Na₂CO₃ + água);

O fluxograma a seguir explica a análise realizada:

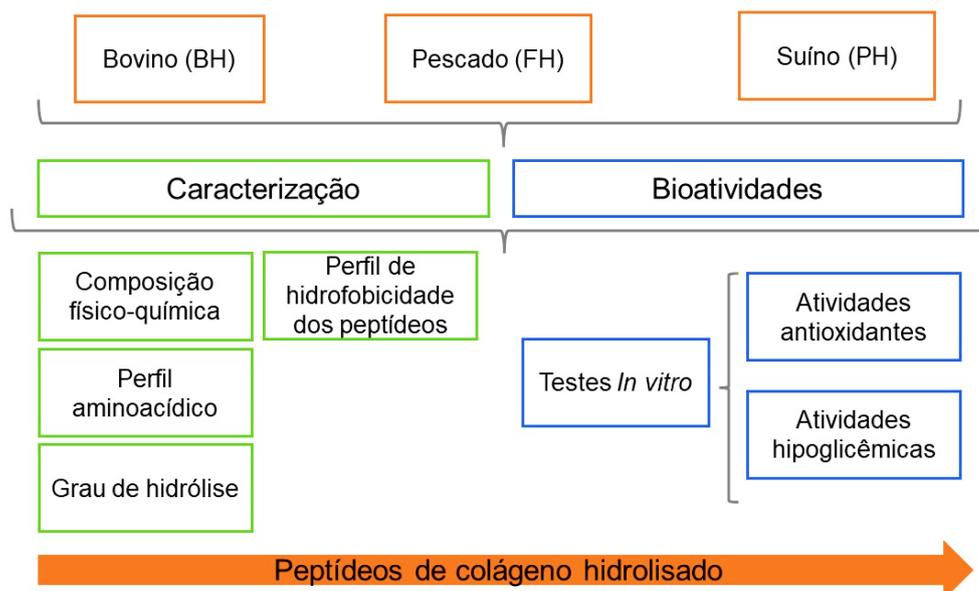


Figura 1. Fluxograma de procedimentos analíticos (Fonte: Autor)

3. Análises estatísticas

Os resultados experimentais foram analisados estatisticamente pelo programa STATGRAPHICS, versão Centurion XV.II por meio de Análise de Variância (ANOVA) e as diferenças entre os grupos estudados foram analisadas por meio do teste de Tukey para comparação de médias ao nível de significância de 5% ($p < 0,05$) A análise de proteção de DNA foi realizada usando GraphPad Prism 8.0.1. Programas.

4. Resultados e Discussões

4.1. Análises Físico-química

Os resultados das análises físico-químicas dos hidrolisados de colágeno são apresentados na Tabela 1. Embora as amostras tenham o mesmo teor de sólidos totais (cerca de 92%), elas variaram em relação ao teor de proteína. O hidrolisado de colágeno suíno (PH) apresentou o maior percentual (97,2%), seguido do hidrolisado de peixe (FH) com 96,6% e bovino (BH) com 94,3, respectivamente. Os colágenos apresentaram em média 7% de umidade e cinzas $\leq 1\%$, sendo que o hidrolisado bovino (BH) apresentou maior porcentagem para ambos os fatores físico-químicos, embora menor teor de proteína em relação aos demais.

Tabela 1. Análises de umidade, cinzas, proteína em base seca para as amostras de colágeno hidrolisado comerciais de diferentes espécies.

Amostras	Teor de sólidos totais	Umidade	Cinzas	Proteína
g/100 g amostra				
BH	92,25±0,06 ^a	7,85±0,18 ^a	1,11±0,005 ^a	94,37±0,06 ^c
FH	92,67±0,06 ^a	7,50±0,30 ^a	0,61±0,02 ^b	96,63±0,06 ^b
PH	92,92±0,4 ^a	7,07±0,02 ^b	0,25± 0,004 ^c	97,20±0,41 ^a

Sendo, BH: colágeno hidrolisado bovino; FH: colágeno hidrolisado de pescado; PH: colágeno hidrolisado suíno. Valores seguidos de mesma letra não diferem entre si, de acordo com o teste de Tukey ($p < 0,05$), referente a leitura na vertical.

A Tabela 2 mostra que as amostras de BH e FH apresentaram maior DH (8,7% e 8,1%, respectivamente), o que está relacionado ao maior percentual de peptídeos menores que 2 kDa. A amostra com PH apresentou a menor DH (6,1%) e, conseqüentemente, a maior porcentagem de peptídeos com peso molecular de 5-10 kDa em relação às demais, representada por 5,3%. Portanto, observou-se que a maior DH está relacionada a uma maior quantidade de peptídeos de menor peso molecular. Vários estudos afirmam que os peptídeos de baixo peso molecular têm maior potencial para atividade biológica (Ahmed et al., 2015; Ao e Li, 2012; Chi et al., 2014; Liu et al., 2012; Rabiei et al., 2019; Shazly et al., 2019).

No entanto, a DH dos peptídeos de colágeno foi relativamente baixa quando comparada a outras proteínas, variando de 8,7 a 6,1% nas diferentes amostras. Outros estudos também mostraram valores de DH abaixo de 10%, confirmando a dificuldade das enzimas em quebrar a estrutura da hélice tripla do colágeno durante a hidrólise (Chi et al., 2014; Jamdar et al., 2010).

Tabela 2. Grau de hidrólise e peso molecular dos colágenos hidrolisados comerciais de diferentes espécies.

Amostra	% GH	%Peso Molecular*				
		0,3 mg/mL	<1 kDa	1-2 kDa	2-5 kDa	5-10 kDa
BH	8,7±0,010 ^a	11,6	62,5	24,3	1,1	0,5
FH	8,1±0,003 ^a	9,2	56,7	32,9	0,9	0,2
PH	6,1±0,008 ^b	7,9	48,9	37,7	5,3	0,1

Sendo, BH: colágeno hidrolisado bovino; FH: colágeno hidrolisado de pescado; PH: colágeno hidrolisado suíno. Valores seguidos de mesma letra não diferem entre si, de acordo com o teste de Tukey ($p < 0,05$), referente a leitura na vertical. *Valores fornecidos pela indústria de peptídeos de colágeno hidrolisado.

Neste estudo, o colágeno foi obtido de uma empresa, portanto os autores não puderam obter informações sobre as enzimas e condições que foram utilizadas no

processo de hidrólise. No entanto, vários estudos têm mostrado que o tipo de enzima usada para quebrar a proteína do colágeno pode influenciar a eficácia da DH. O uso da enzima subtilisina em hidrolisados de gelatina de pele bovina apresentou menor DH em relação aos nossos dados (6,57%) (Nuñez et al., 2020). Além disso, o uso das enzimas pepsina, papaína e protease aumentou a DH no colágeno de peixes em 10, 20 e 28%, respectivamente (Hema et al., 2017). Em outro estudo com colágeno de cabeça de peru, DH variou de acordo com a mistura de enzimas: 5,07% (Alcalase / tripsina), 6,63% (Alcalase / Flavourzyme) e 10,42% com a mistura de três enzimas (alcalase, Flavorzyme e tripsina) (Khiari et al., 2014). Além disso, um estudo com colágeno bovino hidrolisado concluiu que as taxas de clivagem de ligações peptídicas foram maiores com o uso de alcalase e tripsina do que com saborzima (Feng e Betti, 2017).

Outros fatores que podem interferir na degradação do colágeno são as diferentes fontes e espécies animais de onde vem o colágeno. Neste estudo, os peixes hidrolisados (FH) apresentaram menor DH e maiores peptídeos em comparação com as outras duas fontes. Outros estudos também observaram diferenças nas características intrínsecas da estrutura do colágeno entre as peles bovina e suína, o que pode refletir no peso molecular entre as amostras (Klein, Élen, 2016). Alguns autores observaram que as gelatinas de peixe tinham peptídeos de peso molecular inferior do que as gelatinas de porco e bovina (Chiou et al., 2006; Muyonga et al., 2004).

4.2. Avaliação do perfil de aminoácidos totais e livres

Em relação à análise dos aminoácidos totais (Tabela 3), todas as amostras apresentaram elevados teores dos aminoácidos alanina (Ala), glicina (Gly), prolina (Pro), hidroxiprolina (Hyp), ácido aspártico (Asp) e ácido glutâmico (Glu), confirmando estudo de outros autores (Ao e Li, 2012; Bawn, 1987). Esses aminoácidos são característicos daqueles que fazem parte da estrutura tridimensional do colágeno, que possui uma unidade tripla repetida (Gly-XY), na sequência de aminoácidos, sendo X prolina (Pro) e Y hidroxiprolina (Hyp) (Ferreira et al., 2012). Esses aminoácidos hidrofóbicos são

responsáveis pela formação e estabilidade da estrutura específica do colágeno, denominada hélice tripla, provavelmente devido aos aminoácidos envolvidos nas interações hidrofóbicas da proteína, ligações de hidrogênio e interação eletrostática que são responsáveis pela formação e estabilidade da a estrutura específica do colágeno, denominada hélice tripla (DAMODARAN et al., 2018).

Considerando a bioatividade, os aminoácidos Pro e Gly, expressos predominantemente em nossa amostra, estão relacionados à estabilidade e regeneração da cartilagem, apresentando efeitos benéficos ao organismo (Walrand et al., 2008). Além disso, a glicina, um aminoácido alifático muito presente em nossa amostra, participa da síntese do tripeptídeo glutathiona (Glu-Cys-Gly) que desempenha papel fundamental nas reações antioxidantes celulares.

Tabela 3. Distribuição de aminoácidos totais (g/100 g de aminoácidos totais) das amostras comerciais de colágeno hidrolisado.

Aminoácidos Totais (g/100g)	Peptídeos Colágeno		
	BH	FH	PH
Alifáticos			
Alanina	8,75±0,04 ^c	9,86±0,05 ^a	8,68±0,05 ^c
Glicina	20,53±0,18 ^{bc}	20,97±0,18 ^{abc}	20,95±0,18 ^{abc}
Isoleucina	1,45±0,01 ^b	1,34±0,01 ^c	1,21±0,01 ^d
Leucina	3,03±0,01 ^c	2,95±0,01 ^d	3,04±0,01 ^{bc}
Valina	2,36±0,00 ^d	2,53±0,00 ^c	2,56±0,00 ^b
Aromáticos			
Fenilalanina	1,80±0,08 ^c	1,90±0,04 ^{bc}	2,00±0,01 ^{ab}
Tirosina	0,86±0,04 ^{bc}	0,85±0,00 ^c	0,96±0,06 ^{ab}
Hidroxilados			
Serina	3,17±0,01 ^c	3,26±0,01 ^b	3,31±0,01 ^a
Treonina	1,79±0,00 ^d	2,47±0,00 ^a	1,72±0,00 ^e
Sulfurados			
Cistina	0,16±0,00 ^c	0,32±0,00 ^a	0,23±0,01 ^b
Metionina	0,57±0,01 ^c	1,20±0,00 ^a	0,84±0,02 ^b
Ácidos			
Prolina	9,07±0,08 ^b	8,77±0,08 ^c	9,25±0,08 ^b
Hidroxiprolina	10,99±0,09 ^{bc}	9,54±0,06 ^d	11,24±0,16 ^{ab}
Ácidos + amidas			
Ác. Aspártico	5,94±0,03 ^c	5,81±0,03 ^d	6,06±0,01 ^b
Ác. Glutâmico	10,61±0,16 ^{bc}	10,39±0,11 ^c	10,83±0,02 ^{ab}
Básicos			
Arginina	8,21±0,01 ^d	9,08±0,02 ^a	8,43±0,02 ^c
Histidina	1,12±0,00 ^c	1,12±0,00 ^c	1,16±0,00 ^a
Lisina	3,81±0,00 ^c	3,82±0,00 ^c	4,01±0,00 ^b

*Sendo as amostras BH= colágeno hidrolisado de bovino, FH= colágeno hidrolisado de pescado e Amostra PH= colágeno hidrolisado suíno. Médias seguidas de mesma letra não diferem entre si, de acordo com o teste de Tukey ($p \leq 0,05$), referente a leitura na horizontal. ND significa $< 10\text{mg}/100\text{g}$.

Em relação aos aminoácidos livres, a amostra de FH apresentou a maior taxa de liberação (484,9 mg / 100g) em comparação com as outras duas amostras BH (275,1 mg / 100g) e PH (186,6 mg / 100g), apresentando uma variação intrínseca da origem dependente proteína. A maior proporção de aminoácidos liberados na amostra de FH foram alifáticos: alanina, glicina e isoleucina (48,2; 69,9 e 76,6 mg / 100g, respectivamente); a treonina hidroxilada (62,2 mg / 100g) e os aminoácidos ácidos prolina e hidroxiprolina

(101,89 e 20,9 mg / 100g, respectivamente). Em relação à amostra BH, o aminoácido predominante foi o aminoácido aromático fenilalanina (75,9 mg / 100g), enquanto a amostra PH apresentou níveis elevados de cistina e do aminoácido ácido glutâmico (26,5 mg / 100g).

Estudos anteriores sobre peptídeos de caseína demonstram que a presença de aminoácidos hidrofóbicos pode aumentar a atividade antioxidante, porém com baixa estabilidade gástrica após digestão simulada (Xie et al., 2015). Os aminoácidos ácidos com cadeias laterais ionizáveis, principalmente presentes em FH e PH amostras, possuem uma propriedade que proporciona um maior potencial antioxidante, conforme observado em nossas análises de DNA superenrolado para FH e na atividade antioxidante in vitro do PH. É importante lembrar que a variação dos aminoácidos livres em relação às fontes de colágeno também pode ser explicada por uma diferença em relação às enzimas utilizadas para a hidrólise, que podem reconhecer sítios diferentes na proteína.

Tabela 4. Distribuição de aminoácidos livres (mg/100 g de aminoácidos totais) das amostras comerciais de colágeno hidrolisado.

Aminoácidos (mg/100 g)	Peptídeos Colágeno		
	BH	FH	PH
Alifáticos			
Alanina	ND ^b	48,25 ±0 ^a	ND ^b
Glicina	21,52 ±0 ^c	69,97 ±0 ^a	20,14 ±0 ^c
Isoleucina	24,70 ±0 ^d	76,64 ±0 ^a	10,20 ±0 ^d
Leucina	16,10 ±0 ^b	30,50 ±0 ^b	29,00 ±0 ^b
Valina	25,68 ±0 ^b	ND ^c	ND ^c
Aromáticos			
Fenilalanina	75,87 ±0 ^{2b}	20,84 ±0 ^{bc}	ND ^c
Tirosina	21,4 ±0 ^c	ND ^d	22,29 ±0 ^{bc}
Hidroxilados			
Serina	ND ^a	ND ^a	ND ^a
Treonina	27,67 ±0 ^{bc}	61,20 ±0 ^a	32,95 ±0 ^b
Sulfurados			
Cistina	30,82 ±0 ^{ab}	27,44 ±0 ^{bc}	34 ±0 ^a
Metionina	16,13 ±0 ^c	21,74 ±0,02 ^b	17,14 ±0 ^c
Ácidos			
Prolina	14,98 ±0 ^e	101,85 ±0 ^a	27,50 ±0 ^c
Hidroxiprolina	ND ^a	20,98 ± 0	ND ^a
Ácidos + amidas			
Ác. Aspartico	ND ^c	57,54 ±0 ^a	22,19 ±0 ^b

Ác. Glutâmico	11,05 ±0 ^b	10,83 ±0 ^b	26,49 ±0 ^a
	Básicos		
Histidina	23,77 ±0 ^b	40,42 ±0 ^a	ND ^c
Arginina	ND ^a	ND ^a	ND ^a
Lisina	14,43 ±0 ^b	ND ^d	ND ^d

*Sendo as amostras BH= colágeno hidrolisado de bovino, FH= colágeno hidrolisado de pescado e Amostra PH= colágeno hidrolisado suíno. Médias seguidas de mesma letra não diferem entre si, de acordo com o teste de Tukey ($p \leq 0,05$), referente a leitura na horizontal. ND significa < 10mg/100 g.

4.3. Perfil de hidrofobicidade

Os peptídeos de colágeno são consumidos como suplemento dietético porque são facilmente solúveis em água e absorvidos pelo corpo. Portanto, foi considerado o perfil de hidrofobicidade de amostras hidrolisadas de colágeno de origem bovina (BH), peixes (FH) e suína (PH). Em relação à análise de hidrofobicidade, como esperado, todos os hidrolisados apresentaram alta concentração de peptídeos nas partes com menor hidrofobicidade (baixa e intermediária), confirmando a solubilidade em água e / ou solventes polares (Figura 2). O mesmo perfil de cromatograma foi observado por Zhang et al. (2014) para o colágeno bovino, que demonstrou picos unidos sem muita resolução (Zhang et al., 2014). O estudo envolvendo a identificação de peptídeos e sua síntese revela que um grande número de aminoácidos e sequências resultam em agregações por atração de cargas, justificando a dificuldade de obtenção de picos bem definidos. Além disso, como resultado de sua união, bandas são formadas nos produtos de síntese e cromatogramas mais complexos (Hansen e Oddo, 2015).

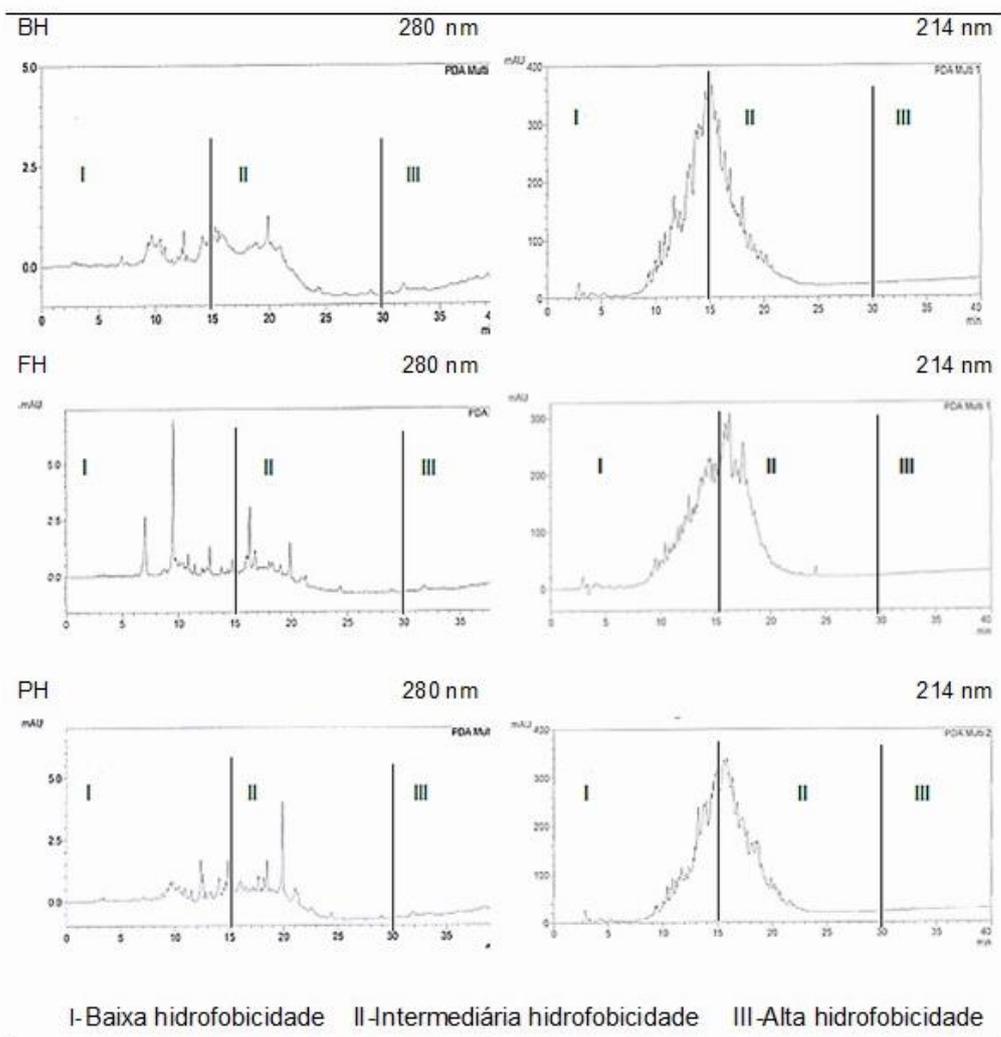


Figura 2. Perfil de hidrofobicidade de peptídeos de colágeno hidrolisados comerciais obtidos a 214 e 280 nm. As separações foram realizadas em gradiente de 0 a 70% de TFA em 0,04% de acetonitrila por 40 minutos, a uma taxa de fluxo de 1 mL / min. BH = hidrolisado bovino; FH = hidrolisado de pescada e PH = hidrolisado suíno.

4.4. Atividades antioxidantes

Os resultados dos ensaios do ORAC e do radical ABTS são apresentados na Tabela 5. Os hidrolisados suínos (PH) apresentaram maior potencial antioxidante na redução do radical ABTS e da capacidade de absorção do radical oxigênio (ORAC). A resposta em relação ao método ORAC torna-se fisiologicamente relevante, visto que este método reflete melhor as ações antioxidantes in vivo (Pior, 2005). Além disso, observou-

se que os colágenos tiveram resultados superiores no ensaio ABTS realizado com peptídeos bioativos de galinha (Bezerra et al., 2020). O potencial antioxidante pode ser influenciado por diversos fatores, como DH e composição de aminoácidos. Embora o PH tenha menor DH e peptídeos de maior tamanho molecular, apresentou maior teor do aminoácido tirosina (22,29 mg / 100g) quando comparado às demais amostras. A tirosina é um aminoácido aromático que apresenta alto potencial antioxidante devido à sua capacidade de doar hidrogênio (de Souza et al., 2019). Além disso, a presença de Tyr nos peptídeos antioxidantes das sementes de Perilla foi essencial para a absorção do radical de oxigênio (ORAC), eliminação do radical ABTS e inibição da peroxidação do ácido linoléico (Hernández-Ledesma et al., 2005).

Tabela 5. Capacidade antioxidante por ORAC e ABTS de peptídeos de colágenos hidrolisados comerciais de diferentes fontes (bovino, pescado e suíno) na concentração de 1000 ppm.

Ensaio ($\mu\text{mol Trolox eq./g}$ amostra)	Bovino (BH)	Pescado (FH)	Suíno (PH)
ORAC	33,06 \pm 1,41 ^b	43,54 \pm 4,50 ^b	67,08 \pm 4,23 ^a
ABTS	47,29 \pm 2,96 ^b	51,57 \pm 1,33 ^b	65,69 \pm 3,53 ^a

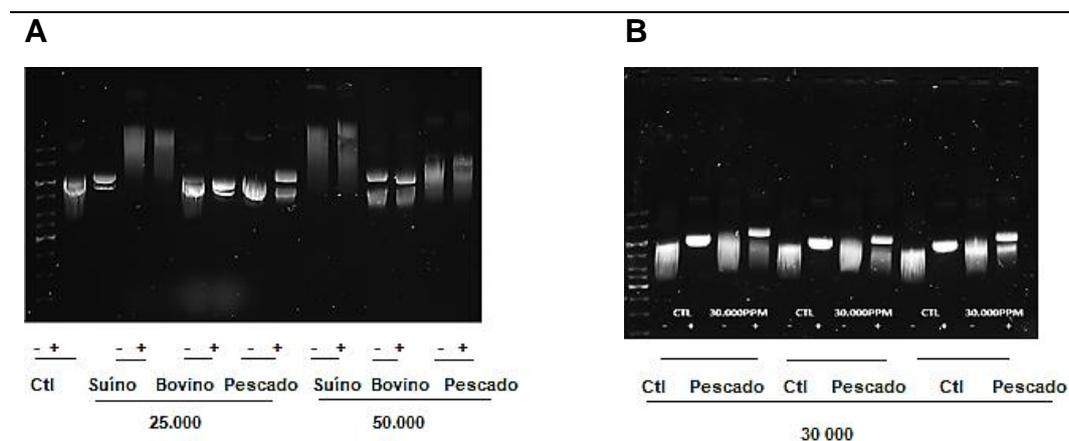
Diferentes letras para o mesmo método indicam que entre as amostras apresentaram diferença significativa pelo teste de Tukey ($p < 0,05$). N=3. Os resultados foram expressos em $\mu\text{mol Trolox eq./g}$ amostra) \pm DP.

Para completar o estudo antioxidante, foi avaliada a capacidade dos peptídeos de colágeno hidrolisados de proteger o DNA superenrolado de espécies reativas de oxigênio geradas pela degradação térmica de AAPH. A oxidação do DNA plasmídico promove a clivagem de uma de suas cadeias superenroladas de fosfodiéster, gerando uma forma linear, aberta e relaxada, sugerindo dano à estrutura (Singh et al., 2009). Para este estudo, foram utilizadas inicialmente concentrações de 25.000 e 50.000 ppm de diferentes fontes de colágeno (bovino, peixe e suíno). A Figura 3A demonstra que os testes com colágenos

suínos não protegeram o DNA superenrolado do agente oxidante (AAPH), uma vez que uma banda de arrasto é observada no gel. Este resultado indica a degradação da estrutura da superespiral do DNA. No entanto, peixes e colágeno bovino protegeram parcialmente o DNA superenrolado a 25.000 ppm, por serem semelhantes ao controle, sem arrastamento da banda. No entanto, essa proteção não foi mantida na concentração máxima de 50.000 ppm.

Em relação aos resultados positivos do colágeno de peixe, sua atividade antioxidante foi confirmada na concentração de 30.000 ppm (Figura 3B). A proteção da banda superenrolada de DNA foi mantida tanto na presença (39,51%) quanto na ausência de AAPH (96,36%) nos peptídeos de colágeno (Figura 3C). Vale ressaltar que mesmo na presença de AAPH, o hidrolisado de peixe protegeu a banda superenrolada da degradação total, apresentando uma diferença significativa na proteção da banda superenrolada do DNA plasmídico, que pode ser considerada um agente antioxidante do DNA plasmídico.

Não há estudos de peptídeos de colágeno hidrolisados em relação à proteção do DNA superenrolado. Outros estudos também demonstraram efeito protetor contra DNA superenrolado, porém com outros tipos de peptídeos derivados de caseína bovina e farinha de castanha de caju (Shazly et al., 2019; Sisconeto Bisinotto et al., 2021).



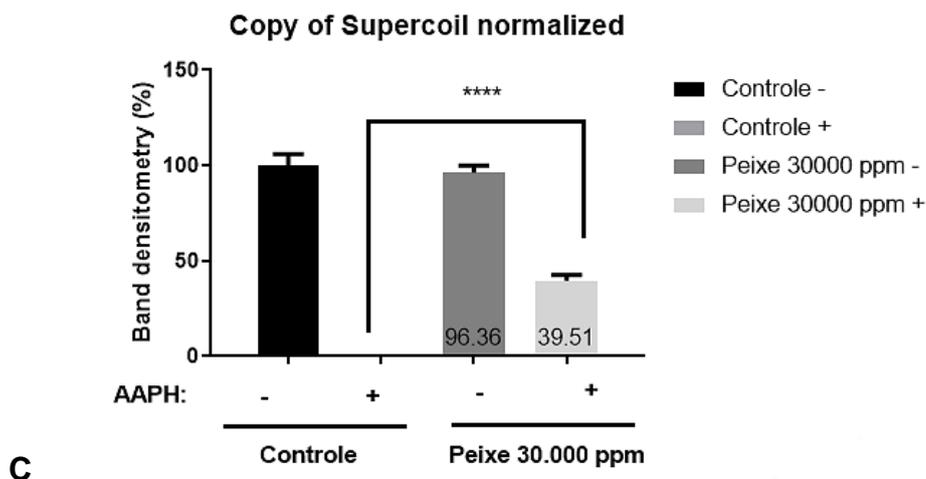


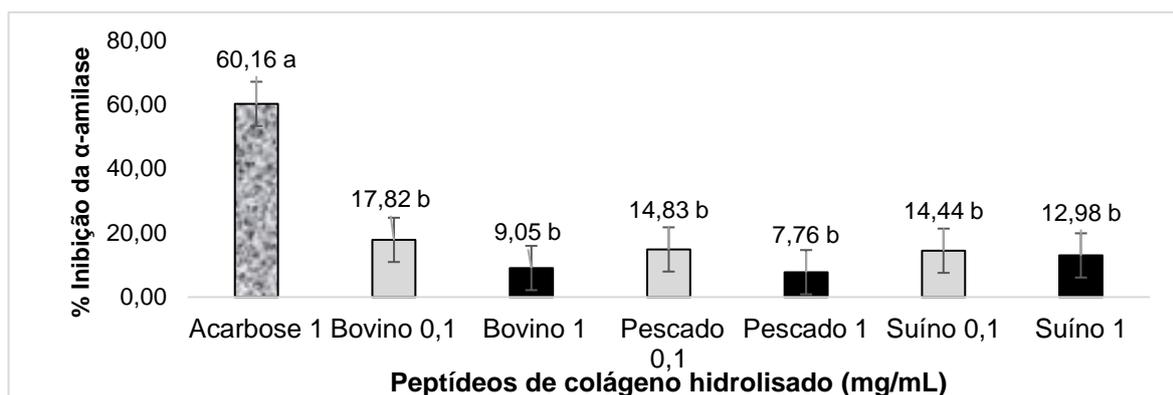
Figure 3. A- Avaliação do efeito protetor de três colágenos hidrolisados de diferentes fontes e ácido gálico (controle positivo) ao DNA, os dados foram analisados usando o programa ImageJ, n = 1; B- Colágeno de peixe hidrolisado na concentração de 30.000 ppm comparado a um controle positivo (ácido gálico), n = 3. Os valores C foram expressos em triplicado como média, n = 3. As análises estatísticas foram realizadas por meio do teste t, no software Prism, com **** <0,0001 para uma diferença significativa. Os sinais + e - indicam a presença ou ausência de AAPH.

5. Avaliação da Inibição da Atividade Hipoglicêmica

Para avaliação da atividade hipoglicemiante foi testada a capacidade dos peptídeos de colágeno em inibir a enzima α -amilase (Fig. 4a). Os resultados foram comparados com o inibidor específico da enzima, a acarbose usada como controle positivo. Foram avaliadas as concentrações de peptídeo de 100 $\mu\text{g/mL}$ e 1000 $\mu\text{g/ml}$, sendo que a menor concentração resultou em maior porcentagem de inibição. As três fontes de colágeno apresentaram porcentagem de inibição próximas a 15,5%, sendo ainda inferiores ao controle positivo, o qual inibiu a enzima em torno de 60% ($p < 0,05$) na concentração de 1000 $\mu\text{g/ mL}$. Portanto, os valores de inibição encontrados nas concentrações avaliadas neste estudo foram relativamente baixos quando comparados a extratos vegetais apresentados pela literatura (Kim *et al.*, 2005; Ranilla *et al.*, 2010; Ohara *et al.*, 2021; WANG *et al.*, 2018)

Para o ensaio de inibição da enzima α -glicosidase, o resultado da concentração da amostra em relação a porcentagem de inibição foi semelhante ao comportamento da amilase. As menores concentrações de hidrolisados (100 $\mu\text{g/mL}$) resultaram em maior porcentagem de inibição. A porcentagem de inibição foi equivalente entre as três fontes de colágeno hidrolisado. O colágeno de pescado apresentou inibição de 14,8%, não diferindo estatisticamente do colágeno bovino e suíno, com 10,4% e 10,9%, respectivamente. Porém, neste ensaio o controle positivo também mostrou menor atividade sobre a enzima, sendo de apenas 33% ($p < 0,05$) sua inibição (Figura 4b). Neste caso, podemos afirmar que em relação a atividade inibitória do controle positivo, a amostra de colágeno hidrolisado de pescado atingiu 50% deste valor.

a



b

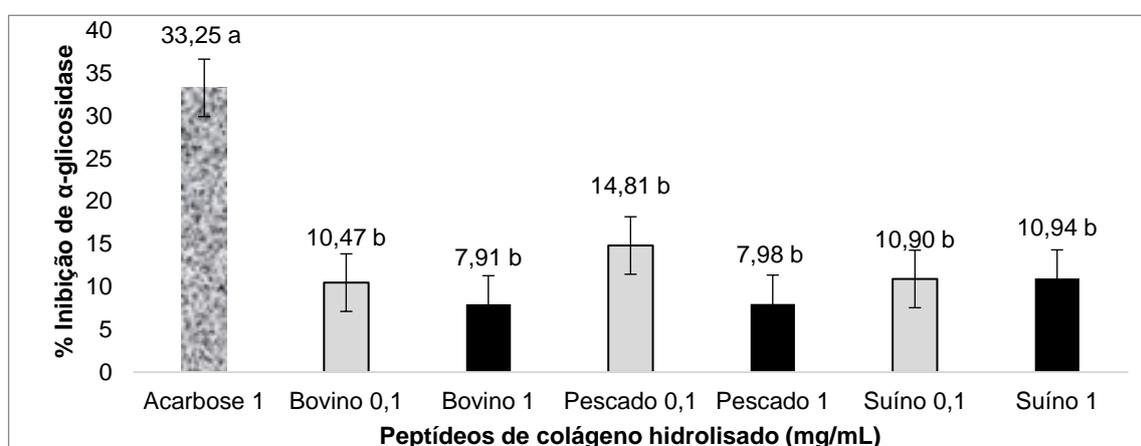


Figura 4. a) Porcentagem de inibição do colágeno hidrolisado de diferentes fontes sobre a enzima α -amilase; b) Porcentagem de inibição do extrato de colágeno hidrolisado de diferentes fontes sobre a enzima α -glicosidase. Os valores foram expressos em média de triplicata, n=3. A,b,c: Diferença significativa entre as concentrações da amostras, pelo teste Tukey ($p < 0,05$).

Nossos resultados mostram a ação hipoglicemiante dos peptídeos de colágeno pela primeira vez na literatura, porém existem outros estudos com peptídeos de origem vegetal (casca de pinheiro; sementes de jamelão; flores secas de Ranawara; teaflavinas e catequinas presentes em chás verdes e pretos; antocianinas de framboesas; elagitaninos presentes nos morangos; pó de açaí; extratos de folhas de oliveira; clorofila; feijão; lentilhas) que indicaram maior inibição das enzimas α -amilase e α -glicosidase (Kim et al., 2005; McDougall et al., 2005; Shinde et al., 2008; Lee et al., 2010; Koch and Deo, 2016; Magro et al., 2019; Ohara et al., 2021)(ABESUNDARA et al., 2004).

Estudos sugerem que a forma de inibição da α -amilase pancreática suína seja de forma competitiva, enquanto que para α -glicosidase de *S. cerevisiae* seria não competitiva, além de que para a acarbose também é um mecanismo de inibição competitiva com essas enzimas (Kim et al., 2005) MÜLLER et al.,1980; KIM et al.,1999). Ademais, a inibição pode variar de uma enzima para outra na mesma concentração de amostra.

5. Conclusão

Os colágenos hidrolisados apresentaram elevado conteúdo proteico com típico perfil aminoacídico independente da espécie animal. Os peptídeos apresentaram baixo peso molecular, contudo com baixa porcentagem de grau de hidrólise, provavelmente devido a complexidade estrutural da matéria prima. A atividade antioxidante foi encontrada em todos os hidrolisados de colágeno, porém com variação em relação a espécie de origem do colágeno, bem como em relação a técnica antioxidante testada. O PH mostrou-se mais

efetivo em relação a técnica DPPH e ORAC, enquanto o colágeno FH apresentou significativa proteção ao DNA. Além disso, pela primeira vez foi mostrado a atividade inibitória dos hidrolisados de colágeno em relação as enzimas gastrointestinais hipoglicemiantes. Portanto, os resultados confirmam que a fonte do colágeno nativo pode influenciar na funcionalidade dos peptídeos de colágenos hidrolisados, provavelmente devido a sua variação na composição aminoacídica e presença de aminoácidos antioxidantes.

Declaração de concorrentes de interesse

Os autores declaram não haver conflito de interesses a declarar.

Agradecimentos

Os autores agradecem o apoio financeiro da FAPESP (processo 2017 / 50349-0). Ana Laís Andrade Gaspari agradece à Fapesp pela bolsa (processo 2019 / 11200-7).

References

- Ahmed, A.S., El-Bassiony, T., Elmalt, L.M., Ibrahim, H.R., 2015. Identification of potent antioxidant bioactive peptides from goat milk proteins. **Food Res. Int.** <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2015.04.032>
- Al-Duais, M., Müller, L., Böhm, V., Jetschke, G., 2009. Antioxidant capacity and total phenolics of *Cyphostemma digitatum* before and after processing: Use of different assays. *Eur. Food Res. Technol.* <https://doi.org/10.1007/s00217-008-0994-8>
- Ao, J., Li, B., 2012. Amino acid composition and antioxidant activities of hydrolysates and peptide fractions from porcine collagen. **Food Sci. Technol. Int.** <https://doi.org/10.1177/1082013211428219>
- AOAC International, 2012. Official Methods of Analysis of AOAC International - 19th Edition, 2012 [WWW Document]. URL <https://www.techstreet.com/standards/official-methods->

of-analysis-of-aoac-international-19th-edition-2012?product_id=1881941 (accessed 4.28.21).

Apostolidis, E., Kwon, Y.I., Ghaedian, R., Shetty, K., 2007. Fermentation of milk and soymilk by *Lactobacillus bulgaricus* and *Lactobacillus acidophilus* enhances functionality for potential dietary management of hyperglycemia and hypertension. **Food Biotechnol.** <https://doi.org/10.1080/08905430701534032>

Bawn, C.S.H., 1987. Encyclopedia of polymer science and engineering. Polymer (Guildf). [https://doi.org/10.1016/0032-3861\(87\)90274-6](https://doi.org/10.1016/0032-3861(87)90274-6)

Bello, A.E., Oesser, S., 2006. Collagen hydrolysate for the treatment of osteoarthritis and other joint disorders: A review of the literature. **Curr. Med. Res. Opin.** <https://doi.org/10.1185/030079906X148373>

Bezerra, T., Estévez, M., Lacerda, J.T., Dias, M., Juliano, M., Mendes, M.A., Morgano, M., Pacheco, M.T., Madruga, M., 2020. Chicken combs and wattles as sources of bioactive peptides: Optimization of hydrolysis, identification by LC-ESI-MS2 and bioactivity assessment. **Molecules.** <https://doi.org/10.3390/molecules25071698>

Bezerra, T.K.A., De Araujo, A.R.R., Do Nascimento, E.S., De Matos Paz, J.E., Gadelha, C.A., Gadelha, T.S., Pacheco, M.T.B., Do Egypto Queiroga, R.D.C.R., De Oliveira, M.E.G., Madruga, M.S., 2016. Proteolysis in goat “coalho” cheese supplemented with probiotic lactic acid bacteria. **Food Chem.** <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.09.066>

Chakrabarti, S., Jahandideh, F., Wu, J., 2014. Food-derived bioactive peptides on inflammation and oxidative stress. **Biomed Res. Int.** 2014. <https://doi.org/10.1155/2014/608979>

Chi, C.F., Cao, Z.H., Wang, B., Hu, F.Y., Li, Z.R., Zhang, B., 2014. Antioxidant and functional properties of collagen hydrolysates from Spanish mackerel skin as influenced by average molecular weight. **Molecules.** <https://doi.org/10.3390/molecules190811211>

- Chiou, B. Sen, Avena-Bustillos, R.J., Shey, J., Yee, E., Bechtel, P.J., Imam, S.H., Glenn, G.M., Orts, W.J., 2006. Rheological and mechanical properties of cross-linked fish gelatins. **Polymer (Guildf)**. <https://doi.org/10.1016/j.polymer.2006.07.004>
- Chisté, R.C., Mercadante, A.Z., Gomes, A., Fernandes, E., Lima, J.L.F.D.C., Bragagnolo, N., 2011. In vitro scavenging capacity of annatto seed extracts against reactive oxygen and nitrogen species. **Food Chem**. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2010.12.139>
- Church, F.C., Swaisgood, H.E., Porter, D.H., Catignani, G.L., 1983. Spectrophotometric Assay Using o-Phthaldialdehyde for Determination of Proteolysis in Milk and Isolated Milk Proteins. **J. Dairy Sci**. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(83\)81926-2](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(83)81926-2)
- Damodaran, S., Parkin, K.L., Fennema, O.R., 2018. Química de los Alimentos de Fennema, Química de Alimentos de Fennema.
- de Souza, R.S.C., Tonon, R.V., Stephan, M.P., Silva, C.M., Penteado, A.L., Cabral, L.M.C., Kurozawa, L.E., 2019. Evaluation of the antioxidant potential of whey protein concentrated by ultrafiltration and hydrolyzed by different commercial proteases. **Brazilian J. Food Technol**. <https://doi.org/10.1590/1981-6723.02118>
- Feng, M., Betti, M., 2017. Transepithelial transport efficiency of bovine collagen hydrolysates in a human Caco-2 cell line model. **Food Chem**. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.12.044>
- Ferreira, A.M., Gentile, P., Chiono, V., Ciardelli, G., 2012. Collagen for bone tissue regeneration. **Acta Biomater**. <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2012.06.014>
- Hagen, S.R., Frost, B., Augustin, J., 1989. Precolumn phenylisothiocyanate derivatization and liquid chromatography of amino acids in food. **J. Assoc. Off. Anal. Chem**. <https://doi.org/10.1093/jaoac/72.6.912>
- Hansen, P.R., Oddo, A., 2015. Fmoc solid-phase peptide synthesis, in: Methods in **Molecular Biology**. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-2999-3_5
- Hema, G.S., Joshy, C.G., Shyni, K., Chatterjee, N.S., Ninan, G., Mathew, S., 2017. Optimization of process parameters for the production of collagen peptides from fish

- skin (*Epinephelus malabaricus*) using response surface methodology and its characterization. **J. Food Sci. Technol.** <https://doi.org/10.1007/s13197-017-2490-2>
- Hernández-Ledesma, B., Dávalos, A., Bartolomé, B., Amigo, L., 2005. Preparation of antioxidant enzymatic hydrolysates from α -lactalbumin and β -lactoglobulin. Identification of active peptides by HPLC-MS/MS. **J. Agric. Food Chem.** <https://doi.org/10.1021/jf048626m>
- Jamdar, S.N., Rajalakshmi, V., Pednekar, M.D., Juan, F., Yardi, V., Sharma, A., 2010. Influence of degree of hydrolysis on functional properties, antioxidant activity and ACE inhibitory activity of peanut protein hydrolysate. **Food Chem.** <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2009.12.027>
- Khiari, Z., Ndagijimana, M., Betti, M., 2014. Low molecular weight bioactive peptides derived from the enzymatic hydrolysis of collagen after isoelectric solubilization/precipitation process of turkey by-products. **Poult. Sci.** <https://doi.org/10.3382/ps.2014-03953>
- Kim, M.J., Lee, S.B., Lee, H.S., Lee, S.Y., Baek, J.S., Kim, D., Moon, T.W., Robyt, J.F., Park, K.H., 1999. Comparative study of the inhibition of α -glucosidase, α -amylase, and cyclomaltodextrin glucanotransferase by acarbose, isoacarbose, and acarviosine-glucose. *Arch. Biochem. Biophys.* <https://doi.org/10.1006/abbi.1999.1423>
- Kim, Y.M., Jeong, Y.K., Wang, M.H., Lee, W.Y., Rhee, H.I., 2005. Inhibitory effect of pine extract on α -glucosidase activity and postprandial hyperglycemia. **Nutrition.** <https://doi.org/10.1016/j.nut.2004.10.014>
- Klein, Élen, N.S.M.C., 2016. Preparo e caracterização reológica de amostras de colágeno parcialmente desnaturadas [WWW Document]. URL [file:///C:/Users/fabia/Downloads/klein 2016.pdf](file:///C:/Users/fabia/Downloads/klein%202016.pdf)
- Koch, E.R., Deo, P., 2016. Nutritional supplements modulate fluorescent protein-bound advanced glycation endproducts and digestive enzymes related to type 2 diabetes mellitus. *BMC Complement. Altern. Med.* <https://doi.org/10.1186/s12906-016-1329-0>

- Lee, W.K., Wong, L.L., Loo, Y.Y., Kasapis, S., Huang, D., 2010. Evaluation of different teas against starch digestibility by mammalian glycosidases. **J. Agric. Food Chem.** <https://doi.org/10.1021/jf903011g>
- Legay, C., Popineau, Y., Bérot, S., & Guéguen, J., 1997. Comparative study of enzymatic hydrolysis of α/β - and γ -gliadins. <https://doi.org/10.1002/food.19970410404>
- Liu, D., Liang, L., Regenstein, J.M., Zhou, P., 2012. Extraction and characterisation of pepsin-solubilised collagen from fins, scales, skins, bones and swim bladders of bighead carp (*Hypophthalmichthys nobilis*). **Food Chem.** <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2012.02.032>
- Magro, A.E.A., Silva, L.C., Raseira, G.B., de Castro, R.J.S., 2019. Solid-state fermentation as an efficient strategy for the biotransformation of lentils: enhancing their antioxidant and antidiabetic potentials. **Bioresour. Bioprocess.** <https://doi.org/10.1186/s40643-019-0273-5>
- Martin, B.W., Marques, M., Gouveia, M., Leal, I., Lee, I.M., Shiroma, E.J., Lobelo, F., Puska, P., Blair, S.N., Katzmarzyk, P.T., Alkandari, J.R., Andersen, L.B., Bauman, A.E., Brownson, R.C., Bull, F.C., Craig, C.L., Ekelund, U., Goenka, S., Guthold, R., Hallal, P.C., Haskell, W.L., Heath, G.W., Inoue, S., Kahlmeier, S., Kohl, H.W., Lambert, E.V., Leetongin, G., Loos, R.J.F., Marcus, B., Martin, B.W., Owen, N., Parra, D.C., Pratt, M., Ogilvie, D., Reis, R.S., Sallis, J.F., Sarmiento, O.L., Wells, J.C., Andersen, L.B., Bull, F.C., Guthold, R., Haskell, W.L., Ekelund, U., Alkandari, J.R., Bauman, A.E., Blair, S.N., Brownson, R.C., Craig, C.L., Goenka, S., Heath, G.W., Inoue, S., Kahlmeier, S., Katzmarzyk, P.T., Kohl, H.W., Lambert, E.V., Lee, I.M., Leetongin, G., Lobelo, F., Loos, R.J.F., Marcus, B., Martin, B.W., Owen, N., Parra, D.C., Pratt, M., Puska, P., Ogilvie, D., Reis, R.S., Sallis, J.F., Sarmiento, O.L., Wells, J.C., World Health Organization, Ferrari De Lima, D., Levy, R.B., Olinda, E., Luiz, C., 2005. Envelhecimento ativo: uma política de saúde / World Health Organization. *Lancet*.
- McDougall, G.J., Shpiro, F., Dobson, P., Smith, P., Blake, A., Stewart, D., 2005. Different

- polyphenolic components of soft fruits inhibit α -amylase and α -glycosidase. **J. Agric. Food Chem.** <https://doi.org/10.1021/jf0489926>
- Moskowitz, R.W., 2000. Role of collagen hydrolysate in bone and joint disease. **Semin. Arthritis Rheum.** <https://doi.org/10.1053/sarh.2000.9622>
- Muyonga, J.H., Cole, C.G.B., Duodu, K.G., 2004. Extraction and physico-chemical characterisation of Nile perch (*Lates niloticus*) skin and bone gelatin. **Food Hydrocoll.** <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2003.08.009>
- Nielsen, P.M., Petersen, D., Dambmann, C., 2001. Improved method for determining food protein degree of hydrolysis. **J. Food Sci.** <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.2001.tb04614.x>
- Núñez, S.M., Cárdenas, C., Pinto, M., Valencia, P., Cataldo, P., Guzmán, F., Almonacid, S., 2020. Bovine skin gelatin hydrolysates as potential substitutes for polyphosphates: The role of degree of hydrolysis and pH on water-holding capacity. **J. Food Sci.** <https://doi.org/10.1111/1750-3841.15299>
- Ohara, A., Cason, V.G., Nishide, T.G., Miranda de Matos, F., de Castro, R.J.S., 2021. Improving the antioxidant and antidiabetic properties of common bean proteins by enzymatic hydrolysis using a blend of proteases. **Biocatal. Biotransformation.** <https://doi.org/10.1080/10242422.2020.1789114>
- Perfetti, R., Barnett, P.S., Mathur, R., Egan, J.M., 1998. Novel therapeutic strategies for the treatment of Type 2 diabetes. **Diabetes. Metab. Rev.** [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1099-0895\(199809\)14:3<207::AID-DMR214>3.0.CO;2-J](https://doi.org/10.1002/(SICI)1099-0895(199809)14:3<207::AID-DMR214>3.0.CO;2-J)
- Porfírio, E., Fanaro, G.B., 2016. Suplementação com colágeno como terapia complementar na prevenção e tratamento de osteoporose e osteoartrite: uma revisão sistemática. **Rev. Bras. Geriatr. e Gerontol.**
- Rabiei, S., Rezaei, M., Asgharzade, S., Nikoo, M., Rafieia-Kopai, M., 2019. Antioxidant and cytotoxic properties of protein hydrolysates obtained from enzymatic hydrolysis of

- Klunzinger's mullet (*Liza klunzingeri*) muscle. **Brazilian J. Pharm. Sci.**
<https://doi.org/10.1590/s2175-97902019000218304>
- Ranilla, L.G., Kwon, Y.I., Genovese, M.I., Lajolo, F.M., Shetty, K., 2010. Effect of thermal treatment on phenolic compounds and functionality linked to type 2 diabetes and hypertension management of peruvian and brazilian bean cultivars (*Phaseolus Vulgaris* L.) using In Vitro methods. **J. Food Biochem.** <https://doi.org/10.1111/j.1745-4514.2009.00281.x>
- Sgarbieri, V.C., Pacheco, M.T.B., Gibrin, N.F., Oliveira, D.A.G. de, Silva, M.E.C., 2020. Importance of Diet, Genetic and Lifestyle on Human Aging, Health and Cognition, Importance of Diet, Genetic and Lifestyle on Human Aging, Health and Cognition. <https://doi.org/10.9734/bpi/mono/978-93-90516-73-5>
- Shazly, A.B., Mu, H., Liu, Z., El-Aziz, M.A., Zeng, M., Qin, F., Zhang, S., He, Z., Chen, J., 2019. Release of antioxidant peptides from buffalo and bovine caseins: Influence of proteases on antioxidant capacities. **Food Chem.**
<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2018.08.137>
- Shinde, J., Taldone, T., Barletta, M., Kunaparaju, N., Hu, B., Kumar, S., Placido, J., Zito, S.W., 2008. α -Glucosidase inhibitory activity of *Syzygium cumini* (Linn.) Skeels seed kernel in vitro and in Goto-Kakizaki (GK) rats. **Carbohydr. Res.**
<https://doi.org/10.1016/j.carres.2008.03.003>
- Singh, B.N., Singh, B.R., Singh, R.L., Prakash, D., Dhakarey, R., Upadhyay, G., Singh, H.B., 2009. Oxidative DNA damage protective activity, antioxidant and anti-quorum sensing potentials of *Moringa oleifera*. **Food Chem. Toxicol.**
<https://doi.org/10.1016/j.fct.2009.01.034>
- Sisconeto Bisinotto, M., da Silva, D.C., de Carvalho Fino, L., Moreira Simabuco, F., Neves Bezerra, R.M., Costa Antunes, A.E., Bertoldo Pacheco, M.T., 2021. Bioaccessibility of cashew nut kernel flour compounds released after simulated in vitro human gastrointestinal digestion. **Food Res. Int.**

<https://doi.org/10.1016/j.foodres.2020.109906>

Truscheit, E., Hillebrand, I., Junge, B., Müller, L., Puls, W., Schmidt, D., 1988. Microbial α -Glucosidase Inhibitors: Chemistry, Biochemistry, and Therapeutic Potential.

https://doi.org/10.1007/978-3-642-73461-8_2

Walrand, S., Chiotelli, E., Noirt, F., Mwewa, S., Lassel, T., 2008. Consumption of a functional fermented milk containing collagen hydrolysate improves the concentration of collagen-specific amino acids in plasma. **J. Agric. Food Chem.**

<https://doi.org/10.1021/jf800691f>

Wang, L., Jiang, Y., Wang, X., Zhou, J., Cui, H., Xu, W., He, Y., Ma, H., Gao, R., 2018. Effect of oral administration of collagen hydrolysates from Nile tilapia on the chronologically aged skin. **J. Funct. Foods.** <https://doi.org/10.1016/j.jff.2018.03.005>

White, J.A., Hart, R.J., Fry, J.C., 1986. An evaluation of the Waters Pico-Tag system for the amino-acid analysis of food materials. **J. Automat. Chem.**

<https://doi.org/10.1155/S1463924686000330>

Xie, N., Wang, B., Jiang, L., Liu, C., Li, B., 2015. Hydrophobicity exerts different effects on bioavailability and stability of antioxidant peptide fractions from casein during simulated gastrointestinal digestion and Caco-2 cell absorption. **Food Res. Int.**

<https://doi.org/10.1016/j.foodres.2015.06.025>

Yarnpakdee, S., Benjakul, S., Kristinsson, H.G., Bakken, H.E., 2015. Preventive effect of Nile tilapia hydrolysate against oxidative damage of HepG2 cells and DNA mediated by H₂O₂ and AAPH. **J. Food Sci. Technol.** [https://doi.org/10.1007/s13197-014-1672-](https://doi.org/10.1007/s13197-014-1672-4)

4

Yu, Z., Yin, Y., Zhao, W., Liu, J., Chen, F., 2012. Anti-diabetic activity peptides from albumin against α -glucosidase and α -amylase. **Food Chem.**

<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2012.06.088>

Zhang, M., Mu, T.H., Sun, M.J., 2014. Purification and identification of antioxidant peptides from sweet potato protein hydrolysates by Alcalase. **J. Funct. Foods.**

<https://doi.org/10.1016/j.jff.2014.02.012>