



UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO
DEPARTAMENTO DE MORFOLOGIA E FISIOLOGIA ANIMAL
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOCÊNCIA ANIMAL

BEATRIZ DE AQUINO MARQUES DA COSTA

PRODUÇÃO DE PROTEASES COLAGENOLÍTICAS DE *Aspergillus heteromorphus* URM 0269 E EXTRAÇÃO EM SISTEMAS DE DUAS FASES AQUOSAS PARA APLICAÇÃO NA HIDRÓLISE DE COLÁGENO

RECIFE

2022

BEATRIZ DE AQUINO MARQUES DA COSTA

PRODUÇÃO DE PROTEASES COLAGENOLÍTICAS DE *Aspergillus heteromorphus* URM 0269 E EXTRAÇÃO EM SISTEMAS DE DUAS FASES AQUOSAS PARA APLICAÇÃO NA HIDRÓLISE DE COLÁGENO

Dissertação de mestrado apresentada ao Programa de Biociência Animal da Universidade Federal Rural de Pernambuco, como pré-requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Biociência Animal.

Orientadora: Profa. Dra. Tatiana Souza Porto

Co-orientador: Dr. Vagne de Melo Oliveira

RECIFE

2022

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

C837p

Costa, Beatriz de Aquino Marques da
PRODUÇÃO DE PROTEASES COLAGENOLÍTICAS DE *Aspergillus heteromorphus* URM 0269 E
EXTRAÇÃO EM SISTEMAS DE DUAS FASES AQUOSAS PARA APLICAÇÃO NA HIDRÓLISE DE
COLÁGENO / Beatriz de Aquino Marques da Costa. - 2022.
85 f. : il.

Orientadora: Tatiana Souza Porto.
Coorientadora: Vagne de Melo Oliveira.
Inclui referências.

Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal Rural de Pernambuco, Programa de Pós-Graduação em
Bióciência Animal, Recife, 2022.

1. *Aspergillus heteromorphus*. 2. Enzimas. 3. Particionamento. 4. Peptídeos. I. Porto, Tatiana Souza,
orient. II. Oliveira, Vagne de Melo, coorient. III. Título

CDD 636.089

BEATRIZ DE AQUINO MARQUES DA COSTA

PRODUÇÃO DE PROTEASES COLAGENOLÍTICAS DE *Aspergillus heteromorphus* URM 0269 E EXTRAÇÃO EM SISTEMAS DE DUAS FASES AQUOSAS PARA APLICAÇÃO NA HIDRÓLISE DE COLÁGENO

**Dissertação de mestrado defendida e aprovada pela
banca examinadora**

Data da aprovação: 29 de julho de 2022

Profa. Dra. Tatiana Souza Porto – Presidente/Orientadora
Universidade Federal Rural de Pernambuco – UFRPE

Prof. Dr. Emmanuel Viana Pontual
Universidade Federal Rural de Pernambuco – UFRPE

Dr. Leandro Fragoso Lins
Universidade Federal Rural de Pernambuco – UFRPE

Dr. Thiago Pajeú do Nascimento
Universidade Federal do Piauí – UFPI

RESUMO

O aumento da demanda dos consumidores por produtos que contenham ingredientes funcionais e benéficos a saúde e bem-estar tem impulsionado o mercado de colágeno e seus hidrolisados. Atrelado a isso, alternativas que venham a baratear a produção desses compostos são incentivadas, levando à investigação da utilização de fungos filamentosos para a produção de proteases, de meios mais simples de extração e purificação dessas enzimas e do potencial de resíduos de pescado como fontes de colágeno. Nesse contexto, o objetivo do presente trabalho foi produzir proteases colagenolíticas a partir de *Aspergillus heteromorphus* URM 0269 usando fermentação em estado sólido, purificá-las utilizando sistema de duas fases aquosas (SDFA) e aplica-las na hidrólise de colágeno. Para isso, o micro-organismo foi cultivado (3g de farelo de trigo, 20% de umidade, 30°C, 96 horas) para obtenção do extrato enzimático bruto. O extrato bruto foi então submetido a um planejamento fatorial (2^3) para purificação de proteases colagenolíticas utilizando SDFA, tendo como variáveis independentes: massa molar de PEG (M_{PEG}), concentração de PEG (C_{PEG}) e concentração de sulfato (C_{sulf}). As proteases extraídas por SDFA PEG/sulfato foram avaliadas quanto a sua estabilidade em diferentes níveis de pH (4,0 – 11,0). Para a obtenção do colágeno, foram utilizados resíduos de pele de cioba (*Lutjanus analis*) submetidos a tratamento com ácido acético (0,5M). A enzima foi particionada preferencialmente para a fase rica em PEG ($K>1$) cujo maior fator de purificação e recuperação ($FP = 6,256$ e $Y = 404,432\%$) foi obtido usando M_{PEG} 8000 g/mol, C_{PEG} 30%, C_{sulf} 10%. A avaliação do efeito do pH sobre a atividade enzimática revelou que a extração em SDFA foi capaz de aumentar a faixa de pH com alta atividade enzimática (7,0 – 11,0) em comparação com o observado no extrato bruto (6,0 – 7,0), assim como a sua estabilidade, mantendo pelo menos 80% de sua atividade proteásica após 20 horas de incubação. A extração do colágeno de pele de cioba (*Lutjanus analis*) resultou em um rendimento de 8,056% e o ensaio de hidrólise utilizando as amostras enzimáticas de extrato bruto e aquelas da fase PEG do SDFA se mostraram capazes de hidrolisar o colágeno extraído, ambas obtendo um pico de hidrólise após 36h de tratamento. A partir dos resultados obtidos no presente trabalho, espera-se que mais estudos sejam desenvolvidos a fim de elucidar as propriedades e potencial biológico dos hidrolisados produzidos.

Palavras-chave: *Aspergillus heteromorphus*, Enzimas, Particionamento, Peptídeos.

ABSTRACT

The increase in consumer demand for products that contain functional ingredients that are beneficial to their health and well-being has increased the market for agents of this nature, such as collagen and its hydrolysates. Thus, research for alternatives that make one or more stages of the production of these compounds more cost-effective is constantly encouraged, leading to the investigation of the use of filamentous fungi to produce proteases, simpler means of extraction and purification of these enzymes and the potential of fish residues as sources of collagen. In this context, the objective of the present work was to produce collagenolytic proteases from *Aspergillus heteromorphus* URM 0269 using solid-state fermentation, extract them using aqueous two-phase system (ATPS) and apply them in collagen hydrolysis. For this, the microorganism was cultivated (3g of wheat bran, 20% humidity, 30°C, 96) to obtain the crude enzymatic extract. The crude extract was then submitted to a factorial design (2^3) for the purification of collagenolytic proteases using ATPS, having as independent variables: PEG molar mass (M_{PEG}), PEG concentration (C_{PEG}) and sulfate (C_{sulf}). Subsequently, the proteases extracted by PEG/sulfate ATPS were evaluated for their stability at different pH levels (4.0 – 11.0). To obtain the collagen, residues of red snapper (*Lutjanus analis*) skin were submitted to treatment with acetic acid (0.5M). The enzyme was partitioned preferentially to the PEG-rich phase ($K>1$) whose highest purification and recovery factor ($PF = 6.256$ and $Y = 404.432\%$) was obtained using M_{PEG} 8000 g/mol, C_{PEG} 30%, C_{sulf} 10%. The evaluation of the effect of pH on the enzymatic activity revealed that the extraction in ATPS was able to increase the pH range with high enzymatic activity (7.0 – 11.0) compared to that observed in the crude extract (6.0 – 7.0), as well as its stability, maintaining at least 80% of their protease activity after 20 hours of incubation for all pH levels analyzed, except for pH 11.0. The extraction of collagen from red snapper skin resulted in a yield of 8.056% and the hydrolysis assay using the enzymatic samples of crude extract and those of the PEG phase of the ATPS were able to hydrolyze the extracted collagen, both obtaining a peak of hydrolysis after 36 hours of treatment. From the results obtained in the present work, it is expected that more studies will be developed to elucidate the properties and biological potential of the hydrolysates produced.

Keywords: *Aspergillus heteromorphus*, Enzymes, Partitioning, Peptides.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	9
2. REVISÃO DE LITERATURA	10
2.1 O gênero <i>Aspergillus</i> na produção de proteases	10
2.2 Extração de proteases com atividade colagenolítica utilizando SDFA	11
2.3 SDFA: Diagrama de fases e fatores que influenciam o particionamento	12
2.3.1 <i>Características do polímero e a presença de sal</i>	13
2.3.2 <i>Hidrofobicidade</i>	14
2.3.3 <i>pH</i>	14
2.3.4 <i>Temperatura</i>	14
2.4 Extração de colágeno de peixes	14
2.5 Colagenases como enzimas produtoras de peptídeos	17
2.6 Peptídeos Bioativos de Colágeno	18
3. OBJETIVOS	20
3.1 Objetivo Geral	20
3.2 Objetivos específicos	20
4. REFERÊNCIAS	21
CAPÍTULO I:	26
PEPTÍDEOS BIOATIVOS DE COLÁGENO: ABORDAGEM BIBLIOMÉTRICA E TENDÊNCIAS DE MERCADO PARA AS FONTES AQUÁTICAS	26
CAPÍTULO II:	60
EXTRAÇÃO DE PROTEASES COLAGENOLÍTICAS DE <i>Aspergillus heteromorphus</i> URM 0269 EM SISTEMA DE DUAS FASES AQUOSAS PARA APLICAÇÃO NA HIDRÓLISE DE COLÁGENO.....	60
5. CONSIDERAÇÕES FINAIS	87

1. INTRODUÇÃO

A tendência global de aumento da busca por um estilo de vida mais saudável, atrelada a mudança de hábitos alimentares e aumento pela demanda por ingredientes funcionais em alimentos, bebidas, produtos farmacêuticos, e de cuidados pessoais tem impulsionado o mercado de produtos como os peptídeos de colágeno (AHMED et al., 2020). De acordo com o relatório “*Collagen Peptides Market*” publicado em 2022 pela *MarketsandMarkets*, o valor estimado do mercado global de peptídeos de colágeno em 2021 atingiu a marca de 631 milhões de dólares, e o crescimento projetado para os 5 anos seguintes é de 31,2%, chegando a 828 milhões de dólares até 2026.

O aumento da demanda por produtos contendo peptídeos de colágeno está ligado diretamente ao crescimento de outro setor, o de produção de proteases colagenolíticas. No entanto, é sabido que essas enzimas têm um custo de produção elevado, devido a fatores como as fontes utilizadas e processos de produção e purificação, por isso, alternativas viáveis de barateamento de uma ou mais etapas da produção dessas enzimas são constantemente incentivadas (BHAGWAT; DANDGE, 2018).

As proteases colagenolíticas são enzimas capazes de degradar a estrutura helicoidal tripla do colágeno, sendo fundamentais para a produção de peptídeos de colágeno. Tanto animais quanto plantas e diversos micro-organismos são produtores de enzimas colagenolíticas, porém, a maioria das colagenases disponíveis atualmente no mercado são de origem bacteriana (BLIEVA et al., 2020). Entre os micro-organismos produtores de enzimas colagenolíticas, os fungos filamentosos apresentam grandes vantagens, como alta produtividade e baixo custo de produção, e facilidade na recuperação das enzimas produzidas (WANDERLEY et al., 2017).

Essas enzimas são utilizadas para produção de fragmentos biologicamente ativos (OLIVEIRA et al., 2019), os chamados “peptídeos bioativos de colágeno” (CHEN et al., 2018; HALIM et al., 2016). Esses fragmentos bioativos podem apresentar funções biológicas variadas, com potencial antioxidante, anti-hipertensivo, antitumoral e cicatrizante, podendo ser empregados pelas indústrias farmacêutica, alimentícia e cosmética com baixo custo e segurança, como na produção de

hidratantes, medicamentos cicatrizantes, suplementos, entre outros (FELICIAN et al., 2019; KUMAR et al., 2019; CHEN et al., 2018).

A ingestão de peptídeos de colágeno de baixo peso molecular (entre 2kDa e 6 kDa) pode melhorar as condições da pele e atenuar os danos induzidos pela radiação UV. Além disso, a capacidade dos peptídeos para resistir em várias condições gastrointestinais e térmicas pode ser útil para a sua aplicação como ingredientes para o desenvolvimento de alimentos funcionais e aplicações nutracêuticas, bem como intensificar seu potencial benéfico para a saúde humana e animal (SINGH e VIJ, 2018). Portanto, objetivo dessa dissertação é produzir e purificar proteases colagenolíticas a partir de *Aspergillus heteromorphus* URM 0269 usando fermentação em estado sólido para aplicação na hidrólise de colágeno.

2. REVISÃO DE LITERATURA

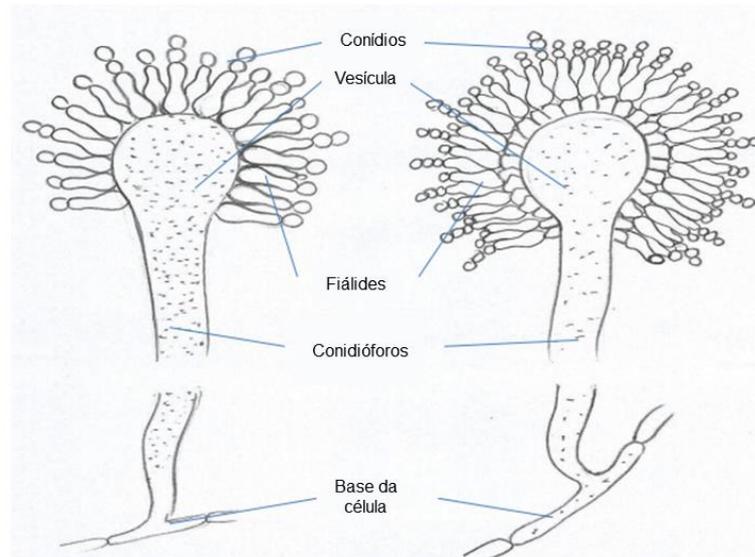
2.1 O gênero *Aspergillus* na produção de proteases

O gênero *Aspergillus* pertence ao filo Ascomycota e são classificados como fungos anamórficos, caracterizados por sua reprodução e germinação assexuada (Figura 1). A maior parte dos *Aspergillus* cresce em ambientes ricos em oxigênio (aeróbios) e se desenvolvem na forma de bolores na superfície dos substratos (SALIHI; ASOODEH; ALIABADIAN, 2017). Apesar de mais de 60 espécies do gênero serem reconhecidas como patógenos, diversas outras são continuamente investigadas quanto a produção de moléculas de interesse, como a produção de celulase por *A. niger* (SIVA et al., 2022), de invertase por *A. brasiliensis* (GUERRERO-URRUTIA et al., 2021), amilase por *A. flavus* (BELTAGY; ABOUELWAFI; BARAKAT, 2022), frutossiltransferase por *A. oryzae* (ALVARADO-OBANDO et al., 2022) e proteases por *A. heteromorphus* (FERNANDES et al., 2020).

Dentre as diversas espécies de fungos filamentosos exploradas no desenvolvimento de processos industriais para a produção de metabólitos e enzimas, se destacam espécies do gênero *Aspergillus*, sendo o *A. niger* um dos mais estudados. A espécie atualmente se estabelece como a mais tradicional fonte fúngica de enzimas e ácidos orgânicos utilizados na indústria (CASTRO; NISHIDE; SATO, 2014). No entanto, o potencial comercial das espécies do gênero é determinado pela

atividade catalítica das enzimas produzidas sob diferentes condições físico-químicas, como temperatura e pH (RAKOV; ALEXANDER, 2019).

Figura 1. Estrutura básica dos fungos do gênero *Aspergillus*.



Fonte: Adaptada de Kaur (2017).

Além de produzirem enzimas de alto valor comercial e variadas aplicações industriais, a utilização de fungos filamentosos como os do gênero *Aspergillus* dá margem ainda a utilização de resíduos agroindustriais durante o seu cultivo (MATEI et al., 2021). A fermentação em estado sólido é considerada o método mais indicado para o seu cultivo, visto que substratos sólidos são os que mais se assemelham ao habitat de origem desses organismos, propiciando seu crescimento e a secreção de enzimas extracelulares (CASTRO; NISHIDE; SATO, 2014). Desta forma a associação de resíduos agrícolas à fermentação em estado sólido resulta em características como: simplicidade de manejo durante a fermentação, baixo custo e alto rendimento e concentração de enzimas secretadas.

2.2 Extração de proteases com atividade colagenolítica utilizando SDFA

Abordagens tradicionais para a separação e purificação de proteases incluem o uso de técnicas como a precipitação, ultrafiltração, cromatografia e a eletroforese. No entanto, esses procedimentos apresentam empecilhos que tornam sua aplicação menos eficiente quanto ao seu custo-benefício (VARADAVENKATESAN et al., 2021),

como alto tempo de processamento, utilização de solventes tóxicos e danosos às amostras analisadas, baixa especificidade e rendimento ou a necessidade de equipamentos e membranas onerosas, como é o caso da cromatografia e ultrafiltração, respectivamente (LIMA et al., 2013), o que inibe sua escalabilidade.

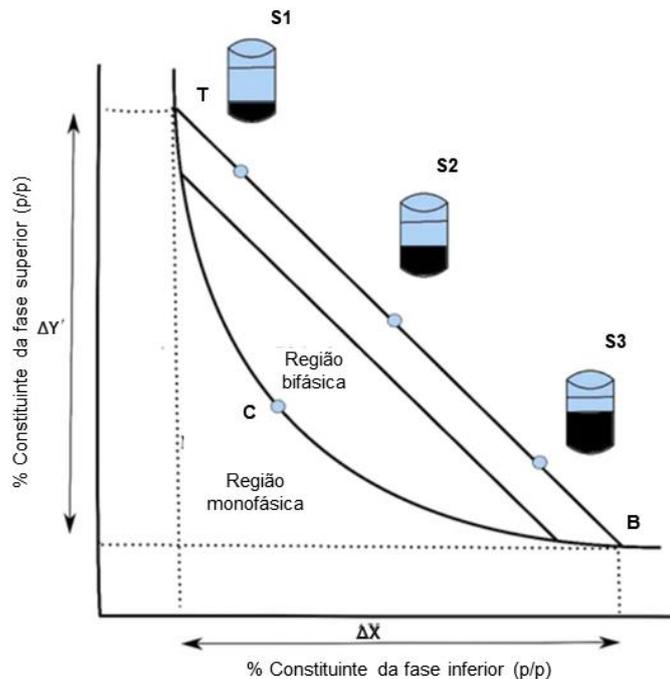
O sistema de duas fases aquosas (S DFA) é uma estratégia que engloba separação, concentração e purificação, atributos ideais em uma técnica de extração. Os S DFAs geralmente são compostos pela mistura de dois polímeros hidrofílicos, um polímero e um sal ou um álcool e um sal, separados de forma espontânea em um meio aquoso (SILVA et al., 2017). O emprego de S DFAs apresenta diversas vantagens como: baixo tempo de processamento; baixo consumo de energia; uso de materiais de baixo custo; baixa complexidade técnica; replicabilidade em diferentes escalas e possibilidade de reutilização dos materiais utilizados (ROSSO et al., 2012), permitindo sua utilização tanto no contexto acadêmico quanto no industrial.

Ao contrário de metodologias danosas a biomoléculas sensíveis, os polímeros utilizados e o teor de água presente nos S DFAs tendem a estabilizar a estrutura proteica e aumentar sua atividade biológica (VARADAVENKATESAN et al., 2021). Dessa forma, os S DFAs têm sido adaptados e utilizados no processo de recuperação e purificação de variados materiais biológicos como anticorpos (CHEN et al., 2022), hormônios (BUARQUE et al., 2020), polissacarídeos (ZHU et al., 2020), compostos fenólicos (XAVIER et al., 2013) e enzimas, como xilanase (LOUREIRO et al., 2017), lipase (SOUZA et al., 2015) catalase (KARAKUS; ISIK, 2019), proteases (FERNANDES et al., 2020) e collagenases (WANDERLEY et al., 2017).

2.3 S DFA: Diagrama de fases e fatores que influenciam o particionamento

O diagrama de fases indica as condições necessárias para o particionamento e formação das fases. O diagrama (Figura 2) apresenta uma curva binodal (TCB), que separa a região bifásica (acima da curva), com concentrações que levam a formação de duas fases imiscíveis, da região homogênea (abaixo da curva). A linha reta no diagrama (TB) é chamada de “linha de amarração” e determinam sistemas com fases em equilíbrio (S1, S2 e S3). O ponto C da curva é chamado de “ponto crítico”. Acima desse ponto, o volume das duas fases é teoricamente igual e o valor do comprimento da linha de amarração é igual a zero (IQBAL et al., 2016).

Figura 2. Representação esquemática do diagrama de fases.



Fonte: Adaptado de Iqbal et al. (2016)

2.3.1 Características do polímero e a presença de sal

A formação de fases no SDFA é influenciada por diferentes fatores como a concentração e a massa molecular do polímero, assim como a própria presença do sal, cuja concentração e composição também altera o comportamento das fases (ASENJO; ANDREWS, 2011). De maneira geral: (1) quanto maior a massa molar do polímero, menor será sua concentração necessária para a formação das fases; (2) quanto maior a massa molar do PEG, menor será o coeficiente de partição (K); (3) em sistemas polímero-sal, quanto maior a concentração do polímero, menor será a partição para a fase rica em polímero, principalmente, por conta da exclusão estérica de biomoléculas da fase ou por mudanças na hidrofobicidade das fases (GRILLO; AIRES-BARROS; AZEVEDO, 2014). Este fenômeno que ocorre no aumento tanto da massa molar como na concentração do polímero é denominado teoria do volume excluído (FERNANDES et al., 2020).

2.3.2 Hidrofobicidade

A hidrofobicidade tem um papel importante no particionamento de proteínas, visto que dois efeitos principais estão envolvidos em interações hidrofóbicas: efeito *salting out* e o efeito de hidrofobicidade da fase. Em sistemas polímero-sal, a hidrofobicidade pode ser alterada pela variação do comprimento da linha de amarração, massa molar do polímero ou pela adição de sal, que tem efeito direto sobre o diagrama de fases. A adição de sal no sistema tem um efeito significativo no coeficiente de partição, pois esses sais contêm íons de diferentes hidrofobicidade e os íons hidrofóbicos forçam a partição da molécula para a fase com maior hidrofobicidade e vice-versa (RAJA et al., 2012).

2.3.3 pH

O pH do sistema pode alterar a carga e as propriedades da superfície do soluto, afetando a partição. A carga da proteína se torna negativa em um sistema com pH mais alto do que o ponto isoelétrico (PI) e positiva em um sistema com pH mais baixo do que o PI. Quando o pH é igual ao PI, a carga líquida é zero. Na literatura, observa-se que o particionamento de biomoléculas com carga negativa em sistemas mais alcalinos resultou no aumento do coeficiente de partição e preferência pela fase superior (rica em PEG) por conta do momento dipolar positivo (IQBAL et al., 2016).

2.3.4 Temperatura

A temperatura tem influência sobre a composição das fases do sistema e, conseqüentemente, sobre o diagrama de fases. Alterações de temperatura afetam o particionamento através da viscosidade e densidade, por isso a manutenção de um controle rígido da temperatura durante a execução da metodologia é recomendada. De maneira geral, a separação das fases é melhor em temperaturas mais baixas em SDFAs polímero-polímero com menores concentrações de polímero, enquanto o efeito inverso é observado em sistemas polímero-sal (WALTER; JOHANSSON, 1994).

2.4 Extração de colágeno de peixes

O colágeno é a proteína fibrosa mais abundante na matriz extracelular, (cerca de 25-35% do conteúdo total de proteínas). O colágeno é um dos principais componentes de do tecido conjuntivo, onde desempenha a função de sustentação

tecidual e proteção mecânica, atuando na manutenção e regeneração dos tecidos, além de algumas funções mais sofisticadas, como armazenamento e liberação de fatores de crescimento. Até o presente momento, 29 subtipos da família das moléculas colagenosas foram catalogados, identificados de I até XXIX, baseado na estrutura, função e propriedades. Dentre estes, o colágeno no tipo 1 (COL-I) é o mais abundante (90% do colágeno total), seguido de outros comumente encontrados como os tipos COL-II, COL-III e COL-IV (OLATUNJI, 2020; LIM *et al.*, 2019).

As moléculas colagenosas têm como sua estrutura molecular característica a forma de tripla hélice, composta por três cadeias α -polipeptídicas posicionadas em torno de um eixo central. Essa conformação se dá pela repetição de domínios glicina (GLY) – “X” – “Y”, onde “X” e “Y” são prolina e hidroxiprolina, respectivamente (ADAMIAK; SIONKOWSKA, 2020). A alta concentração de glicina na estrutura, garante a essas moléculas sua rigidez e estabilidade características, devido às ligações de hidrogênio que esse aminoácido é capaz de produzir entre os grupamentos amina ($-N - H_2$) e o grupo carbonila ($-CO-$) de cadeias adjacentes (LEÓN-LÓPEZ *et al.*, 2019).

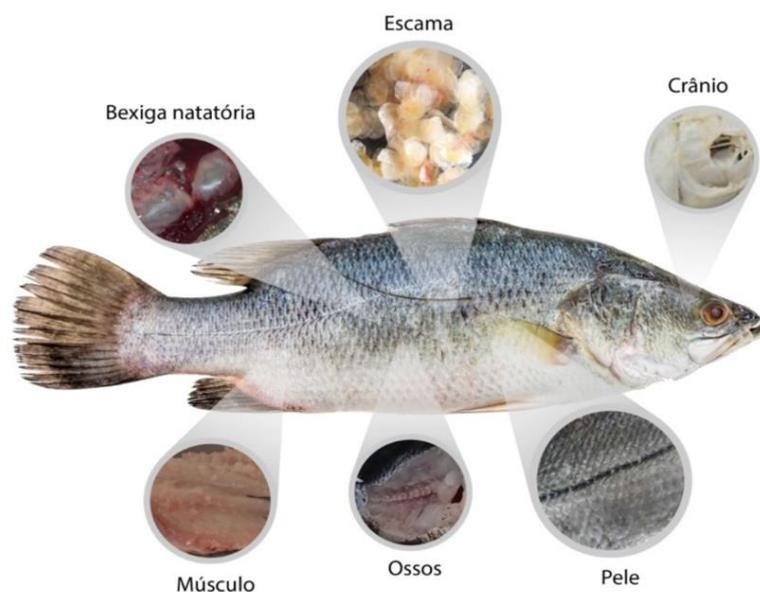
O colágeno tem uma variedade de aplicações possíveis, por isso, tem sido buscado por diversas indústrias (farmacêutica, alimentícia, cosmética, biomédica, têxtil) e suas potencialidades, como sua biocompatibilidade e alta disponibilidade, são continuamente investigadas (YORGANCIOGLU *et al.*, 2020). A alta disponibilidade do colágeno se deve a diversidade de fontes possíveis para a sua obtenção. As fontes mais tradicionais para extração do colágeno são provenientes da agropecuária, como as fontes bovinas, suínas e de aves, dos quais podem ser aproveitados pele, ossos e tendões, materiais que comumente não são destinados ao consumo e acabam por serem descartados (LIM *et al.*, 2019).

No entanto, algumas preocupações relacionadas a utilização desses animais como fontes, desde zoonoses transmitidas mamíferos terrestres (encefalopatia espongiforme bovina, gripe suína) e a aves (gripe aviária) até limitações culturais/religiosas presentes em algumas culturas acerca do consumo dessas espécies, levaram a busca por outras fontes e ascensão da investigação do colágeno de fontes aquáticas, que não têm as mesmas limitações culturais e estão

geneticamente distantes o suficiente dos mamíferos para evitar a transmissão de doenças (YORGANCIOGLU et al., 2020).

Organismos aquáticos como vertebrados marinhos (mamíferos, peixes teleósteos e cartilagosos), esponjas, estrelas-do-mar, anemônas-do-mar, águas-vivas e alguns crustáceos podem ser utilizados como matéria-prima para obtenção de colágeno, a partir do aproveitamento de pele, escamas, cartilagens e carapaças (Figura 3). A utilização desses seres representa vantagens quando comparada ao uso de mamíferos terrestres como: processo de extração facilitado; erradicação do risco de transmissão das patologias que atingem especificamente os mamíferos; alta disponibilidade dessas fontes (LIM et al., 2019).

Figura 3. Exemplos de subprodutos da indústria pesqueira com potencial para obtenção de colágeno.



Fonte: Oliveira et al. (2021).

O processo de obtenção do colágeno é composto por etapas de preparação (pré-tratamento), extração e recuperação, estando suscetível a variações (OLATUNJI, 2020). Durante o pré-tratamento, é feita a limpeza e separação das amostras, seguida de um tratamento químico para a remoção de moléculas não-colagenosas, como lipídios e outras proteínas (AHMED et al., 2020). A etapa de extração pode ser realizada a partir do emprego de soluções ácidas (GIRALDO-RIOS; RIOSZAPATA-MONTOYA, 2020), alcalinas, exposição a temperaturas elevadas (LIU et al., 2015) ou

até atividade enzimática (IDEIA et al., 2019), de acordo com a espécie e a parte do animal utilizada, assim como o conteúdo da amostra aplicada.

No método ácido-solúvel (ASC), as soluções ácidas são utilizadas com a finalidade de clivar ligações não-covalentes e tornar o colágeno mais solúvel e remover moléculas não-colagenosas sem causar danos a sua estrutura. Os ácidos mais comuns utilizados nas soluções são o ácido acético, ácido láctico, ácido cítrico e ácido clorídrico (LIM et al., 2019). No método pepsina-solúvel (PSC), enzimas proteolíticas (frequentemente a pepsina), são utilizadas para aumentar a solubilidade das moléculas colagenosas através da quebra de algumas ligações peptídicas de forma específica, o que também contribui para uma menor geração de resíduos e aumento do rendimento ao final do processo da extração (IDEIA et al., 2019; BLANCO et al., 2017). Vale destacar que, apesar de uma metodologia aparte, o tratamento enzimático é geralmente realizado em conjunto com um tratamento químico prévio.

2.5 Colagenases como enzimas produtoras de peptídeos

Para a produção de peptídeos a partir de uma molécula colagenosa nativa é necessária a prévia desnaturação de sua estrutura, que não é facilmente degradada por qualquer enzima. Por isso, para a sua produção se faz necessário o tratamento químico prévio do colágeno nativo ou a utilização da gelatina como matéria-prima. A partir do colágeno desnaturado são empregadas proteases com atividade colagenolítica, enzimas capazes de clivar a tripla hélice do colágeno de forma específica (OLIVEIRA et al., 2017). Assim, as cadeias polipeptídicas geradas se tornam susceptíveis a ação de outras proteases, que, por sua vez, auxiliam na clivagem das estruturas em fragmentos ainda menores (OLATUNJI, 2020), variando entre 3-6 kDa, a depender das enzimas empregadas no processo e suas respectivas ligações-alvo.

A produção de enzimas colagenolíticas é relevante para diversas atividades industriais, como na composição de detergentes (SINGH; MANGLA; SINGH, 2021; SILVA et al., 2018), o processamento de couro (HASAN; HAQUE; RAHMAN, 2022), processamento de pescado e fabricação de alimentos e bebidas, além de produtos da indústria farmacêutica, cosmética e seu uso em pesquisas científicas ligadas à fisiologia humana e animal (PAL; PV, 2016; DABOOR et al., 2012). Devido a sua alta

demanda, estudos acerca da produção dessas enzimas têm se concentrado na investigação de micro-organismos capazes de sintetizá-las intensivamente.

Tradicionalmente, os micro-organismos estudados mais extensamente quanto à produção de proteases colagenolíticas são bactérias do gênero *Bacillus*, no entanto, o potencial dos fungos filamentosos na produção enzimática (BLIEVA et al., 2020), atrelado às características intrínsecas à biologia desses organismos (material de menor custo, maior produtividade, produção mais rápida) atraem a atenção da academia e indústria para a sua utilização por tornarem o processo produtivo menos oneroso (LIMA et al., 2021).

2.6 Peptídeos Bioativos de Colágeno

A hidrólise de uma molécula com alta massa molecular como o colágeno, leva a geração de fragmentos de menor peso molecular, conhecidos como peptídeos. Esses produtos gerados apresentam propriedades e utilidades variáveis, diferentes daquelas observadas nas moléculas nativas. Assim, ao longo dos anos foram investigados hidrolisados de diferentes fontes como leveduras (MARSON et al., 2020), leite (AL-SHAMSI et al., 2018), resíduos lignocelulósicos (LI; QIWAN, 2020), carne suína, carne de aves (WANG & SHAHIDI, 2018) e resíduos pesqueiros (DE et al., 2020; KRASNOVA; SEMENOV; ZARUBIN, 2020), sendo os últimos fontes promissoras de colágeno.

A hidrólise do colágeno desintegra suas ligações de hidrogênio, o que resulta na conversão de sua estrutura nativa (tripla-hélice) em estruturas espirais “aleatórias”. Esse produto pode ser fracionado ainda mais para obtenção de uma variedade de subunidades menores, com propriedades modificadas (menor viscosidade, baixo Ponto Isoelétrico, aumento da biodisponibilidade) (LEÓN-LÓPEZ et al., 2019; CHEN et al., 2014). No entanto, a desagregação de uma estrutura fibrosa como a do colágeno é mais difícil de ser realizada quando comparada a proteínas globulares, o que leva a uma baixa taxa de hidrólise. Essa característica torna o colágeno vantajoso para aplicações comerciais (ARAÚJO et al., 2020). Os principais produtos desta hidrólise são: a gelatina e os peptídeos com funções biológicas diversificadas de acordo com a fonte de colágeno (HALIM et al., 2016).

Peptídeos são fragmentos de baixa massa molecular obtidos a partir da clivagem de uma proteína, e são dotados de características não observadas na molécula nativa, como maior biodisponibilidade e absorção pelo organismo, o que propicia suas variadas atividades biológicas (ZAMORANO-APODACA et al., 2020; CHUN et al., 2017). Há uma grande variedade de propriedades alcançáveis a partir da hidrólise do colágeno, como diferentes solubilidades, ações no organismo e condições ótimas de atividade (LEÓN-LÓPEZ et al., 2019).

Os peptídeos são fisiologicamente importantes para o organismo, desempenhando funções fisiológicas importantes, são exemplos: Insulina (hormônio liberado pelo pâncreas, responsável pela redução da glicemia sanguínea) (QASEM et al., 2019); Ocitocina (neurotransmissor secretado pela hipófise, essencial durante o parto e lactação) (SUZUKI, 2018); Peptídeo Natriurético Atrial (produzido pelo tecido cardíaco, atuando na manutenção da homeostase do tecido cardiovascular) (MAISEL et al., 2018); e Gastrina (associada ao estímulo da liberação do ácido gástrico pelo estômago e ao comportamento alimentar) (BOHLER et al., 2019).

Os peptídeos de colágeno, por sua vez, são conhecidos por funções biológicas como: potencial antioxidante (WU et al., 2018); anti-hipertensivo (inibidor de enzima conversora de angiotensina (ECA)) (FU et al., 2016); antitumoral (KISLING; LUST; KATWA, 2019); cicatrizante (YAMANAKA; OKADA; SANADA, 2017); antienvelhecimento (ZHANG et al., 2020) e formação e manutenção óssea (ZHU et al., 2020), podendo ser empregados pelas indústrias farmacêuticas e cosméticas como na produção de hidratantes e medicamentos cicatrizantes, assim como na indústria alimentícia na produção de alimentos e bebidas funcionais, suplementos alimentares, fortificantes, entre outros, beneficiando a saúde humana e animal (FELICIAN et al., 2019; KUMAR et al., 2019).

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

Produzir e purificar proteases colagenolíticas a partir de *Aspergillus heteromorphus* URM 0269 usando fermentação em estado sólido para aplicação na hidrólise de colágeno.

3.2 Objetivos específicos

- Desenvolver uma revisão com análise bibliométrica acerca dos peptídeos de colágeno oriundos de organismos aquáticos e suas aplicações;
- Realizar fermentação em estado sólido para produção de colagenase por *A. heteromorphus* URM 0269;
- Particionar e extrair a protease colagenolítica produzida por *A. heteromorphus* URM 0269 usando sistemas de duas fases aquosas;
- Hidrolisar colágeno extraído de peixe utilizando a colagenase produzida por *A. heteromorphus* URM 0269.

4. REFERÊNCIAS

- ADAMIÁK, K.; SIONKOWSKA, A. Current methods of collagen cross-linking: Review. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 161, p. 550-560, 2020.
- AL-SHAMSI, K. et al. Camel milk protein hydrolysates with improved technofunctional properties and enhanced antioxidant potential in in vitro and in food model systems. **Journal of Dairy Science**, v. 101, n. 1, p. 47-60, 2018.
- ALVARADO-OBANDO, M. et al. Engineering a heterologously expressed fructosyltransferase from *Aspergillus oryzae* N74 in *Komagataella phaffii* (*Pichia pastoris*) for kestose production. **New Biotechnology**, v. 69, p. 18-27, 2022.
- AHMED, M. et al. Extraction and characterization of gelatin from camel skin (potential halal gelatin) and production of gelatin nanoparticles. **Saudi Journal of Biological Sciences**, v. 27, n. 6, p. 1596-1601, 2020.
- ARAUJO, J. et al. Enzymatic Hydrolysis of Fish Waste as an Alternative to Produce High Value-Added Products. *Waste and Biomass Valorization*, v. 12, n. 2, p. 847-855, 2020.
- ASENJO, J.; ANDREWS, B. Aqueous two-phase systems for protein separation: A perspective. **Journal of Chromatography**, v. 1218, n. 49, p. 8826-8835, 2011.
- BELTAGY, E.; ABOUELWAFI, A.; BARAKAT, K. Bioethanol production from immobilized amylase produced by marine *Aspergillus flavus* AUMC10636. **The Egyptian Journal of Aquatic Research**, 2022.
- BHAGWAT, P.; DANDGE, P. Collagen and collagenolytic proteases: A review. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 15, p. 43-55, 2018.
- BLANCO, M. et al. Hydrolysates of Fish Skin Collagen: An Opportunity for Valorizing Fish Industry Byproducts. **Marine Drugs**, v. 15, n. 5, Artigo 131, 2017.
- BLIEVA, R. et al. Collagenase Production by Immobilized Fungal Association of *Aspergillus Awamori* 16 and *Aspergillus Awamori* 22. **Indian Journal of Agricultural Research**, v. 54, n. 1, p. 122-126, 2020.
- BOHLER, M. et al. Gastrin releasing peptide-induced satiety is associated with hypothalamic and brainstem changes in chicks. **Neuroscience Letters**, v. 713, Artigo 134529, 2019.
- BUARQUE, F. et al. Selective extraction of female hormones using aqueous two-phase system composed of double protic ionic liquid + acetonitrile. *Fluid Phase Equilibria*, v. 508, p. 112443, 2020.
- CASTRO, R.; NISHIDE, T.; SATO, H. Production and biochemical properties of proteases secreted by *Aspergillus niger* under solid state fermentation in response to different agroindustrial substrates. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 3, n. 4, p. 236-245, 2014.
- CHEN, L. et al. Effects of pressure on gelatinization of collagen and properties of extracted gelatins. **Food Hydrocolloids**, v. 36, p. 316-322, 2014.
- CHEN, Y. et al. Antioxidant and anti-inflammatory capacities of collagen peptides from milkfish (*Chanos chanos*) scales. *Journal of Food Science and Technology*, v. 55, n. 6, p. 2310-2317, 2018.

- CHEN, X. et al. Separation of antibody IgG201 by an aqueous two-phase system with recyclable pH-responsive polymers. *Process Biochemistry*, v. 113, p. 125-133, 2022.
- CHUN, J.; MIN, S.; JO, Y. Production of low molecular collagen peptides-loaded liposomes using different charged lipids. **Chemistry and Physics of Lipids**, v. 209, p. 1-8, 2017.
- Collagen Peptides Market Global Outlook, Trends, and Forecast to 2026 | MarketsandMarkets. Disponível em: <<https://www.marketsandmarkets.com/Market-Reports/collagen-peptide-market-248590980.html>>. Acesso em: 16 maio. 2022.
- DE, D. et al. Effect of fish waste hydrolysate on growth, survival, health of *Penaeus vannamei* and plankton diversity in culture systems. **Aquaculture**, v. 524, Artigo 735240, 2020.
- FELICIAN, F. et al. The wound healing potential of collagen peptides derived from the jellyfish *Rhopilema esculentum*. **Chinese Journal of Traumatology**, v. 22, n. 1, p. 12-20, 2019.
- FERNANDES, L. et al. Purification and characterization of a novel *Aspergillus heteromorphus* URM 0269 protease extracted by aqueous two-phase systems PEG/citrate. **Journal of Molecular Liquids**, v. 317, p. 113957, 2020.
- FU, Y. et al. Angiotensin I-converting enzyme-inhibitory peptides from bovine collagen: insights into inhibitory mechanism and transepithelial transport. *Food Research International*, v. 89, p. 373-381, 2016.
- GUERRERO-URRUTIA, C. et al. Solid-state fermentation enhances inulinase and invertase production by *Aspergillus brasiliensis*. **Process Biochemistry**, v. 108, p. 169-175, 2021.
- GIRALDO-RIOS, D.; RIOS, L.; ZAPATA-MONTOYA, J. Kinetic modeling of the alkaline deproteinization of Nile-tilapia skin for the production of collagen. *Heliyon*, v. 6, n. 5, Artigo 03854, 2020.
- GRILO, A.; RAQUEL AIRES-BARROS, M.; AZEVEDO, A. Partitioning in Aqueous Two-Phase Systems: Fundamentals, Applications and Trends. **Separation & Purification Reviews**, v. 45, n. 1, p. 68-80, 2014.
- HALIM, N.; YUSOF, H.; SARBON, N. Functional and bioactive properties of fish protein hydrolysates and peptides: A comprehensive review. *Trends in Food Science & Technology*, v. 51, p. 24-33, 2016.
- HASAN, M.; HAQUE, P.; RAHMAN, M. Protease enzyme based cleaner leather processing: A review. **Journal of Cleaner Production**, v. 365, p. 132826, 2022.
- IDEIA, P. et al. Fish Processing Industry Residues: A Review of Valuable Products Extraction and Characterization Methods. **Waste and Biomass Valorization**, v. 11, n. 7, p. 3223-3246, 2019.
- KARAKUS, Y.; ISIK, S. Partial characterization of *Bacillus pumilus* catalase partitioned in poly(ethylene glycol)/sodium sulfate aqueous two-phase systems. *Preparative Biochemistry and Biotechnology*, v. 49, n. 4, p. 391-399, 2019.
- KISLING, A.; LUST, R.; KATWA, L. What is the role of peptide fragments of collagen I and IV in health and disease?. **Life Sciences**, v. 228, p. 30-34, 2019.

- KRASNOVA, I.; SEMENOV, G.; ZARUBIN, N. Modern technologies for using fish wastes in the production of collagen hydrolysates and functional beverages. **IOP Conference Series: Earth and Environmental Science**, v. 421, Artigo 062030, 2020.
- KUMAR, A. et al. Marine collagen peptide as a fortificant for biscuit: Effects on biscuit attributes. **LWT- Food Science and Technology**, v. 109, p. 450-456, 2019.
- LEÓN-LÓPEZ, A. et al. Hydrolyzed Collagen—Sources and Applications. **Molecules**, v. 24, n. 22, p. 4031, 2019.
- LI, P. et al. Extraction and characterization of collagen from sea cucumber (*Holothuriacinerascens*) and its potential application in moisturizing cosmetics. **Aquaculture**, v. 515, p. 734590, 2020.
- LI, Q. et al. Plastein from hydrolysates of porcine hemoglobin and meat using Alcalase and papain. **Food Chemistry**, v. 320, p. 126-654, 2020.
- LI, Y.; QIWAN, B.; WAN, Y. Separation of monosaccharides from pretreatment inhibitors by nanofiltration in lignocellulosic hydrolysate: Fouling mitigation by activated carbon adsorption. **Biomass and Bioenergy**, v. 136, Artigo 105527, 2020.
- LIM, Y. et al. Marine Collagen as A Promising Biomaterial for Biomedical Applications. **Marine Drugs**, v. 17, n. 8, p. 467, 2019.
- LIMA, C. et al. Two-phase partitioning and partial characterization of a collagenase from *Penicillium aurantiogriseum* URM4622: Application to collagen hydrolysis. **Biochemical Engineering Journal**, v. 75, p. 64-71, 2013.
- LIU, D. et al. Effects of alkaline pretreatments and acid extraction conditions on the acid-soluble collagen from grass carp (*Ctenopharyngodon idella*) skin. **Food Chemistry**, v. 172, p. 836-843, 2015.
- MAISEL, A.; DURAN, J.; WETTERSTEN, N. Natriuretic Peptides in Heart Failure. **Heart Failure Clinics**, v. 14, n. 1, p. 13-25, 2018.
- MARSON, G. et al. Proteolytic enzymes positively modulated the physicochemical and antioxidant properties of spent yeast protein hydrolysates. **Process Biochemistry**, v. 91, p. 34-45, 2020.
- MATEI, J. et al. Agro-industrial wastes for biotechnological production as potential substrates to obtain fungal enzymes. **Ciência e Natura**, v. 43, p. e72, 2021.
- OLATUNJI, O. Aquatic Biopolymers: Understanding their Industrial Significance and Environmental Implications. 1. ed. [s.l.] Springer International Publishing, 2020.
- OLIVEIRA, V. et al. Extração de Colágeno de Subprodutos de Peixes. *Bioquímica & Biotecnologia de Organismos Aquáticos - Guia Teórico-Prático de Atividades Experimentais para Estudantes e Profissionais - Bioquímica com ênfase na Biotecnologia*, p. 93-112, 2021.
- OLIVEIRA, V. et al. Crosslink-free collagen from *Cichlaocellaris*: Structural characterization by FT-IR spectroscopy and densitometric evaluation. **Journal of Molecular Structure**, v.1176, p.751-758, 2019.
- OLIVEIRA, V. et al. Colágeno: características gerais e produção de peptídeos bioativos - uma revisão com ênfase nos subprodutos do pescado. **Acta Of Fisheries and Aquatic Resources**, v. 5, n. 2, p. 56-68, 2017.
- PAL, G.; PV, S. Microbial collagenases: challenges and prospects in production and potential applications in food and nutrition. *RSC Advances*, v. 6, n. 40, p. 33763-33780, 2016.

- QASEM, R. et al. Identification of recombinant human insulin and biosynthetic insulin analogues by multiplexed targeted unlabeled mass spectrometry of proteotypic tryptic peptides. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 172, p. 357-363, 2019.
- RAJA, S. et al. Aqueous Two Phase Systems for the Recovery of Biomolecules – A Review. **Science and Technology**, v. 1, n. 1, p. 7-16, 2012.
- RAKOVA, A.; ALEXANDER, O. Protease production by *Aspergillus alliaceus* 7dN1. **Journal of Biotechnology**, v. 305, p. S58-S59, 2019.
- SALIHI, A.; ASOODEH, A.; ALIABADIAN, M. Production and biochemical characterization of an alkaline protease from *Aspergillus oryzae* CH93. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 94, p. 827-835, 2017.
- SILVA, O. et al. Partitioning and extraction protease from *Aspergillus tamaritii* URM4634 using PEG-citrate aqueous two-phase systems. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 9, p. 168-173, 2017.
- SILVA, O. et al. Purification and characterization of a novel extracellular serine-protease with collagenolytic activity from *Aspergillus tamaritii* URM4634. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 117, p. 1081-1088, 2018.
- SINGH, B. P., VIJ, S. In vitro stability of bioactive peptides derived from fermented soy milk against heat treatment, pH and gastrointestinal enzymes. **LWT- Food Science and Technology**, v.91, p.303–307, 2018.
- SINGH, S.; MANGLA, J.; SINGH, S. Evaluation of *Aspergillus fumigatus* NTCC1222 as a source of enzymes for detergent industry. **Resources, Environment and Sustainability**, v. 5, p. 100030, 2021.
- SIVA, D. et al. Enhanced cellulase enzyme production by *Aspergillus niger* using cellulase/iron oxide magnetic nano-composites. **Journal of King Saud University - Science**, v. 34, n. 1, p. 101695, 2022.
- SOUZA, P. et al. Production, purification and characterization of an aspartic protease from *Aspergillus foetidus*. **Food and Chemical Toxicology**, v. 109, p. 1103-1110, 2017.
- SOUZA, R. et al. Aqueous two-phase systems based on cholinium salts and tetrahydrofuran and their use for lipase purification. **Separation and Purification Technology**, v. 155, p. 118-126, 2015.
- SUZUKI, Y. Development of a fluorescent peptide for the highly sensitive and selective detection of oxytocin. **Sensors and Actuators B: Chemical**, v. 254, p. 321-328, 2018.
- WANDERLEY, M. et al. Purification and characterization of a collagenase from *Penicillium* sp. UCP 1286 by polyethylene glycol-phosphate aqueous two-phase system. **Protein Expression and Purification**, v. 133, p. 8-14, 2017.
- VARADAVENKATESAN, T. et al. Recovery of value-added products from wastewater using Aqueous Two-Phase Systems – A review. **Science of The Total Environment**, v. 778, p. 146293, 2021.
- WALTER, H.; JOHANSSON, G. Aqueous two-phase systems. San Diego: Academic Press, 1994.

- WU, R. et al. Antioxidant and anti-freezing peptides from salmon collagen hydrolysate prepared by bacterial extracellular protease. **Food Chemistry**, v. 248, p. 346-352, 2018.
- XAVIER, L. et al. Aqueous two-phase systems for the extraction of phenolic compounds from eucalyptus (*Eucalyptus globulus*) wood industrial wastes. *Journal of Chemical Technology & Biotechnology*, v. 89, n. 11, p. 1772-1778, 2013.
- YAMANAKA, H.; OKADA, S.; SANADA, H. A multicenter, randomized, controlled study of the use of nutritional supplements containing collagen peptides to facilitate the healing of pressure ulcers. **Journal of Nutrition & Intermediary Metabolism**, v. 8, p. 51-59, 2017.
- YORGANCIOGLU, A.; BAŞARAN, B.; SANCAKLI, A. Value Addition to Leather Industry Wastes and By-Products: Hydrolyzed Collagen and Collagen Peptides. *Waste in Textile and Leather Sectors*, 2020.
- ZAMORANO-APODACA, J. et al. Biological and functional properties of peptide fractions obtained from collagen hydrolysate derived from mixed by-products of different fish species. **Food Chemistry**, v. 331, Artigo 127350, 2020.
- ZHANG, Z. et al. The effects and mechanism of collagen peptide and elastin peptide on skin aging induced by D-galactose combined with ultraviolet radiation. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v. 210, Artigo 111964, 2020.
- ZHU, L. et al. Porcine bone collagen peptides promote osteoblast proliferation and differentiation by activating the PI3K/Akt signaling pathway. **Journal of Functional Foods**, v. 64, p. 103697, 2020.
- ZHU, L. et al. The application of an aqueous two-phase system combined with ultrasonic cell disruption extraction and HPLC in the simultaneous separation and analysis of solanine and Solanum nigrum polysaccharide from Solanum nigrum unripe fruit. **Food Chemistry**, v. 304, p. 125383, 2020.

CAPÍTULO I:**PEPTÍDEOS BIOATIVOS DE COLÁGENO: ABORDAGEM BIBLIOMÉTRICA E TENDÊNCIAS DE MERCADO PARA AS FONTES AQUÁTICAS**

Beatriz de Aquino Marques da Costa¹, Ana Lúcia Figueiredo Porto¹, Vagne de Melo Oliveira¹, Tatiana Souza Porto¹

¹Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal, Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE), Rua Manuel de Medeiros, s/n - Dois Irmãos, Recife, Pernambuco, 52171-900, Brasil

RESUMO

O desenvolvimento da indústria de peptídeos de colágeno está relacionado à novas tendências de consumo por parte da população, com projeção de alcance de um valor de US\$ 795 milhões até 2025. Dada a relevância do tema, no presente trabalho é fornecida uma visão geral sobre colágeno, suas fontes e aplicações, assim como são discutidas as propriedades e bioatividades dos peptídeos formados a partir de sua hidrólise. Além disso, para a obtenção de um panorama global das tendências de publicação, co-autoria e co-ocorrência de palavras-chave, foi realizada uma análise bibliométrica. Os dados bibliométricos foram obtidos na plataforma *Web of Science*, com a utilização dos descritores “*marine collagen peptide*”, “*marine collagen peptides*”, “*aquatic collagen peptide*”, “*aquatic collagen peptides*”, “*marine collagen hydrolysate*”, “*marine collagen hydrolysates*”, “*aquatic collagen hydrolysate*” e “*aquatic collagen hydrolysates*” e do operador booleano “OR”, a fim de incluir na pesquisa termos que abrangem as possíveis variações utilizadas pelos autores. A partir dos resultados obtidos, foram selecionados artigos e revisões publicados entre o ano 2000 e 2021. A partir da análise dos dados coletados, ficou evidente a natureza ainda relativamente recente da pesquisa de peptídeos de colágeno derivados de organismos aquáticos e o destaque de países da Ásia e Europa como líderes no segmento. A análise de co-autoria revela uma rede de colaboração entre autores/instituições ainda escassa e fortemente restrita a pesquisadores/instituições da mesma região. A análise de co-ocorrência revela que grande parte dos trabalhos são relacionados a área da saúde, destacando seu potencial na prevenção/tratamento de doenças. Diante dos resultados obtidos, espera-se que o crescimento do ramo produtor e comercial desses peptídeos seja acompanhado pela amplificação da colaboração entre autores e instituições de diferentes territórios, estabelecendo uma rede global de parcerias.

ABSTRACT

The development of the collagen peptides industry is related to new consumption trends in the population, with a projection of reaching a value of 795 million USD by 2025. Given the relevance of the topic, the present work provides an overview on collagen, its sources and applications, as well as the properties and bioactivities of the peptides formed from its hydrolysis are discussed. In addition, to showcase a global overview of publication trends, co-authorship and co-occurrence of keywords, a bibliometric analysis was performed. Bibliometric data were obtained from the Web of Science platform, using the descriptors “*marine collagen peptide*”, “*marine collagen peptides*”, “*aquatic collagen peptide*”, “*aquatic collagen peptides*”, “*marine collagen hydrolysate*”, “*marine collagen hydrolysates*”, “*aquatic collagen hydrolysate*” and “*aquatic collagen hydrolysates*” and the Boolean operator “OR”, to include terms that cover the possible variations used by the authors in the search. From the results obtained, articles and reviews published between 2000 and 2021 were selected. From the analysis of the data collected, it became evident the still relatively recent nature of the research on collagen peptides derived from aquatic organisms and the role of countries in Asia and Europe as leaders in the segment. The co-authorship analysis reveals that the collaboration network between authors/institutions is still scarce and strongly restricted to researchers/institutions in the same region. The co-occurrence analysis reveals that most of the works are related to the health area, highlighting its potential in the prevention/treatment of diseases. In view of the results obtained, it is expected that the growth of the production and commercial branch of these peptides will be accompanied by the amplification of collaboration between authors and institutions from different territories, establishing a global network of partnerships.

1. INTRODUÇÃO

A manutenção de um estilo de vida saudável é primordial para a prevenção e/ou tratamento de doenças crônicas, tais como diabetes, hipertensão, câncer; além de uma série de outras doenças inflamatórias e/ou autoimunes que limitam o bem-estar e ameaçam a vida de pacientes acometidos mais gravemente. A conscientização deste fato acarreta o aumento da exigência dos consumidores por alternativas mais naturais e saudáveis através do uso de produtos e suplementos alimentícios, fármacos, compostos nutracêuticos, além de produtos cosméticos. Neste cenário, os peptídeos produzidos à base de colágeno de fontes sustentáveis surgem como aliados terapêuticos, tendo sido cada vez mais incentivado seu uso no mercado global, principalmente devido às suas inúmeras propriedades benéfica à saúde (AHMED; VERMA; PATEL, 2020).

O segmento produtor de peptídeos de colágeno vem tendo um crescimento exponencial nos últimos anos, fato relacionado principalmente à nova tendência de consumo por parte da população. O crescimento do mercado global de peptídeos de colágeno se reflete em números expressivos, tendo atingido o patamar de US\$ 599 milhões em 2020, com uma projeção de desenvolvimento e alcance da marca de US\$ 795 milhões até 2025, numa expansão que deve atender aos mercados Europeus, da América do Norte e do Sul, além da Ásia (MARKETS AND MARKETS, 2021).

No mercado comercial, as principais apresentações dos peptídeos de colágeno são nas formas seca e em pó, requeridas principalmente pela indústria de alimentos e bebidas, onde são adicionados a suas preparações (como suplementos nutritivos e alimentos funcionais). Além disso, ressalta-se o aproveitamento dos peptídeos pelas indústrias farmacêuticas, biomédicas e até cosméticas, onde o colágeno e seus derivados são focos de cada vez mais estudos relacionados à suas propriedades e aplicações (NUÑES et al., 2020). Uma das formas de mapear as tendências dentro desta área de pesquisa tem sido o uso de ferramentas computacionais e softwares que ajudam a agrupar e identificar os padrões de estudo dos peptídeos e suas aplicações ao longo do tempo. Nesse contexto, o objetivo do presente trabalho é realizar uma revisão utilizando dados bibliométricos acerca dos peptídeos de

colágeno, focando nas novas tendências de mercado para o produto de fonte aquática.

2. METODOLOGIA

A abordagem metodológica foi realizada tomando como base dois momentos distintos de pesquisa: (1) levantamento e catalogação de dados científicos para o embasamento teórico; e, (ii) levantamento bibliométrico de dados científicos.

(i) Levantamento e Catalogação dos dados científicos:

Para o desenvolvimento desta revisão bibliográfica foram realizadas buscas a partir de bancos de dados científicos, como *ScienceDirect* (<https://www.sciencedirect.com/>), *Elsevier* (<https://www.elsevier.com/>), *Scopus* (<https://www.scopus.com/>), *PubMed* (<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/>), *Wiley Online Library* (<https://onlinelibrary.wiley.com/>) e o *Google Scholar* (<https://scholar.google.com.br/>), utilizando como palavras-chave: “*collagen*”, “*collagen sources*”, “*aquatic collagen*”, “*collagen properties*”, “*collagen extraction*”, “*collagen hydrolysis*”, “*collagen peptides*”, “*collagen bioactive peptides*”, “*collagen peptides applications*”. Para tanto, realizou-se a leitura dos títulos e resumos para seleção dos artigos, livros, capítulos de livro, notas científicas, entre outros, excluindo os que não estavam dentro da proposta ou mesmo que não continham informações relevantes para a investigação. Foram incluídas publicações em inglês e português que atenderam aos critérios de busca. Dessa forma, uma revisão bibliográfica foi realizada a fim de compor a fundamentação teórica e reunir o conhecimento atualmente presente na literatura científica acerca das propriedades, fontes e técnicas de extração do colágeno, assim como métodos de produção, aplicações e bioatividades dos peptídeos obtidos a partir de sua hidrólise.

(ii) Abordagem bibliométrica dos dados:

Os dados bibliométricos utilizados nessa pesquisa foram obtidos na plataforma online *Web of Science*. Os descritores utilizados na base de dados foram: “*marine collagen peptide*”, “*marine collagen peptides*”, “*aquatic collagen peptide*”, “*aquatic collagen peptides*”, “*marine collagen hydrolysate*”, “*marine collagen hydrolysates*”, “*aquatic collagen hydrolysate*” e “*aquatic collagen hydrolysates*”. Todos os termos foram buscados no campo “Tópico”, para que incluíssem resultados de títulos, resumos,

palavras-chave dos autores e palavras-chaves Plus, recurso próprio da base de dados que expande o conjunto de palavras-chaves relacionadas aos documentos elencando termos frequentemente citados ao longo dos trabalhos. Além das palavras-chave, o operador booleano “OR” foi empregado a fim de incluir na pesquisa termos que abrangem as possíveis variações utilizadas pelos autores. A partir dos resultados obtidos, foram selecionados apenas artigos científicos e artigos de revisão publicados entre os anos de 2000 e 2021, visto que esse tipo de publicação fornece dados científicos mais completos.

Os dados da busca (registro completo e referências citadas) foram então exportados e lançados no *software* de análise de dados bibliométricos *VOSviewer*® (versão 1.6.17), que é capaz de criar redes e formar *clusters* (agrupamentos) de dados através da análise da intensidade de sua correlação. O *software* Microsoft Excel também foi utilizado para organizar os dados obtidos da pesquisa. No presente trabalho, foram analisadas as relações de co-autoria entre pesquisadores, organizações, universidades e países, a fim de identificar redes de colaboração. Ademais, a co-ocorrência de palavras-chaves entre os trabalhos da área de interesse foi analisada, a fim de evidenciar tendências dentro do campo de pesquisa. Um resumo do processo de busca e obtenção dos dados bibliométricos está ilustrado na Figura 1.

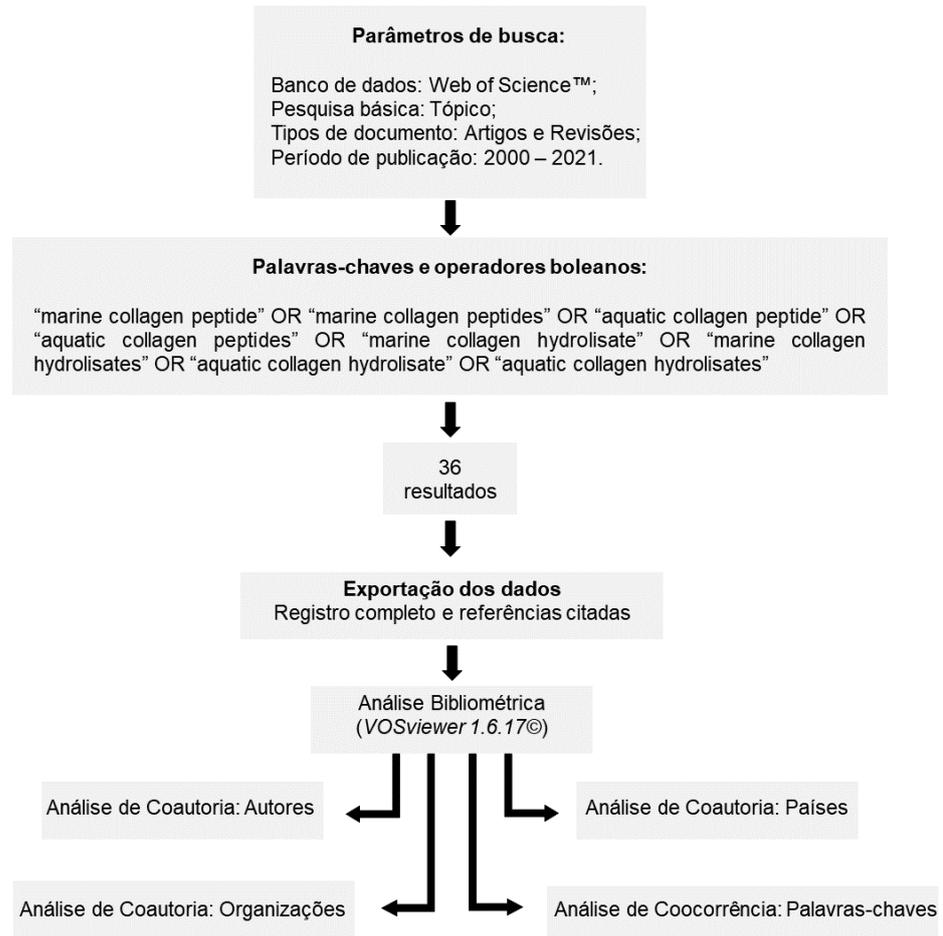


Figura 1. Fluxograma do processo de busca e obtenção dos dados bibliométricos utilizados na análise.

3. Colágeno: fontes, extração e propriedades.

O colágeno é a proteína fibrosa mais abundante nos animais, representando até 30% de todo seu conteúdo proteico. Estruturalmente, as fibras do colágeno se apresentam na forma de uma tripla hélice, formada por 3 subunidades torcidas ao redor de um eixo único (CHEN et al., 2021). As fontes mais tradicionais de colágeno são bovinos (SONG et al., 2021), suínos (ZHU et al., 2020) e aves (HONG et al., 2021), porém, ao longo dos anos, a investigação de fontes aquáticas tem ganhado força (SALVATORE et al., 2020). Essa mudança de panorama se deve a percepção dos benefícios dessas fontes alternativas, que incluem biocompatibilidade e biodegradabilidade, além de vantagens particulares dos organismos aquáticos como a falta de impedimentos culturais e religiosos para seu consumo (observados quanto ao consumo de bovinos e suínos em algumas culturas), uma maior diversidade de

organismos a serem utilizados e por não estarem associados à transmissão zoonoses, como as fontes bovinas (encefalopatia espongiforme bovina) e avícolas (gripe aviária) (AKITA et al., 2020; DAVE et al., 2019).

Os ecossistemas marinhos são fontes de uma série de produtos valiosos, desde minerais, ácidos graxos, aminoácidos, compostos bioativos e proteínas, como colágeno, uma proteína de alto valor comercial e biológico (OLATUNJI, 2020; DAVE et al., 2019). O colágeno de organismos marinhos pode ser extraído de vertebrados, como de peixes (SHANG et al., 2020) e invertebrados, tais como moluscos, esponjas, pepinos-do-mar, anêmonas do mar (LI et al., 2020; FERRARIO et al., 2017).

A obtenção do produto colagenoso de fontes aquáticas é similar ao de organismos terrestres, podendo se dá através de um método isolado ou de uma combinação de técnicas, utilizando principalmente, ácidos, sais, meios de hidrólise enzimática, além de métodos mais inovadores, como a utilização do ultrassom (Figura 2). Igualmente relevante, o pré-tratamento do material é uma etapa crucial, que consiste na retirada de impurezas (proteínas não colagenosas, material gorduroso, detritos e sujidades), além de propiciar a redução de tamanho das amostras, aumentando o contato das partes com as soluções de extração (AHMED; VERMA; PATEL, 2020), o que pode melhorar o rendimento de obtenção da matéria-prima (OLIVEIRA et al., 2021).

A extração do colágeno se dá a partir de uma variedade de técnicas, com metodologias e vantagens/desvantagens igualmente variáveis: (1) A solubilização em ácido se baseia na característica do colágeno de ser mais solúvel em ácido do que em água. Dessa forma, a solução ácida aumenta a repulsão entre as moléculas de tropocolágeno, levando à sua solubilização. Este colágeno é designado Ácido Solúvel (ASC) (AHMED; VERMA; PATEL, 2020); (2) Outro método aplicado é o de hidrólise enzimática, que geralmente é empregado sozinho e/ou em conjunto com o método ácido, visando aumentar o rendimento final da extração. Nesse método, as enzimas mais utilizadas são: pepsina, papaína e colagenase, sendo a pepsina a mais empregada no aproveitamento de resíduos pesqueiros (enzima comercial e/ou extraída da própria espécie de pescado) (LI et al., 2020); (3) O método de solubilização em sal, apesar de menos requisitado (por conta da menor solubilidade do colágeno nesse meio e conseqüentemente menor rendimento), também pode ser utilizado. Para essa técnica, geralmente são utilizadas soluções de cloreto de sódio (NaCl) (OLIVEIRA et al., 2021).

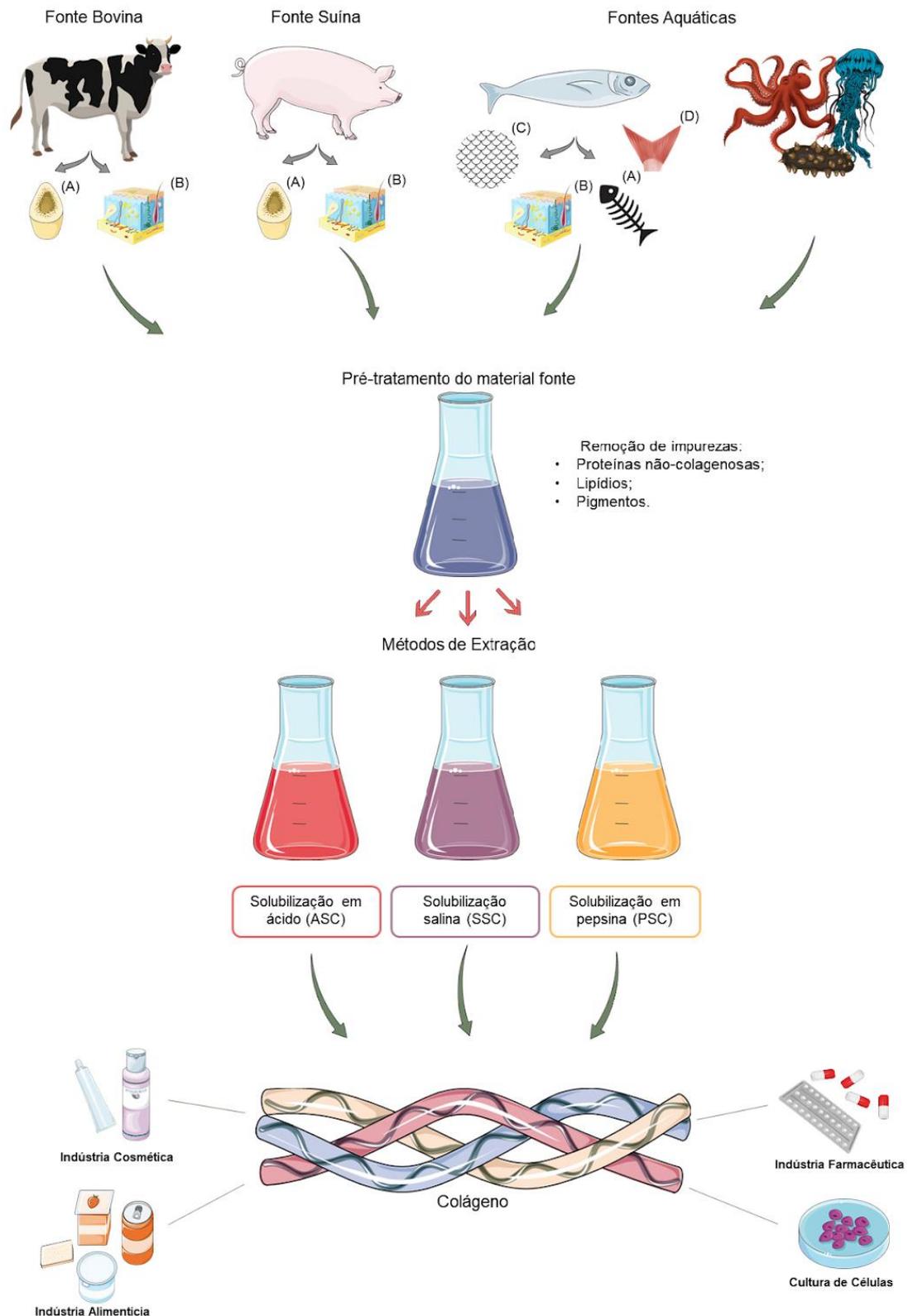


Figura 2. Principais fontes e métodos de extração do colágeno empregados pelo mercado global de proteínas. Fonte: Própria. Imagens: SMART – Servier Medical Art.

Novas abordagens têm despontado a fim de auxiliar e otimizar os métodos já estabelecidos de extração, diminuindo o tempo e/ou o consumo de energia e a

necessidade de reagentes durante esse processo, tais como: ultrassonicação (ALI, KISHIMURA; BENJAKUL, 2018), eletrodialise (CHEN et al., 2019), precipitação isoelétrica (LIN et al., 2019) e extrusão-hidroextração (HUANG et al., 2016), todas já empregadas com sucesso em processos de extração de colágeno de origem aquática em diferentes áreas biotecnológicas.

4. Peptídeos de colágeno de fontes aquáticas: Bioatividades.

Bioquimicamente, os peptídeos de baixo peso molecular são identificados através de sequências curtas (cerca de 2-20 aminoácidos) resultantes da clivagem de uma proteína por enzimas proteases (CHEN et al., 2021). Apesar de serem derivados de proteínas mais complexas, os peptídeos apresentam propriedades biológicas distintas destas e uns dos outros. Os peptídeos de colágeno são conhecidos na literatura científica devido suas bioatividades, como: antioxidante (Chen et al., 2018), anti-hipertensiva (Chen et al., 2021), quelante de ferro (LUO et al., 2020), cicatrizante (LAKRA; KIRANSAI KORRAPATI, 2022), antimicrobiana (Ahmed & Chun, 2018) e antiadipogênica (LEE et al., 2017), atendendo os diferentes setores como indústria farmacêutica (produtos cosméticos e nutracêuticos), biomédica e alimentícia. Tais propriedades são aproveitadas por esses segmentos para a preparação de produtos benéficos e seguros, devido a sua biocompatibilidade, baixa alergenicidade e degradabilidade. Além disso, devido à sua baixa massa molar, os peptídeos de colágeno são de fácil digestão e absorção pelo organismo animal (NUÑEZ et al., 2020).

4.1 Atividade Antioxidante

Antioxidantes são compostos ativos que atuam protegendo as células dos efeitos nocivos dos radicais livres, através da remoção do excesso destas espécies, de modo a evitar o estresse oxidativo por meio da interrupção da cadeia de reações oxidativas dentro das células (WEI et al., 2021). As espécies reativas de oxigênio (ERO) ou “radicais livres” são formas químicas altamente reativas formadas durante o metabolismo do oxigênio, incluindo: radicais hidroxila (OH), radicais ânion superóxido (O_2^-), peróxido de hidrogênio (H_2O_2), radicais peroxil (ROOH) e radicais nítróxido (NO) (WU et al., 2018). Ao passo que a ocorrência destas espécies é natural,

sua geração também pode ser exacerbada por fatores externos ligados ao estilo de vida do indivíduo, como exposição a radiação solar, poluição e substâncias químicas danosas, que causam estresse oxidativo (produção exagerada de radicais livres) e, conseqüente, danos ao seu material genético, proteínas e lipídios, entre outros danos fisiológicos, como o envelhecimento precoce, o desenvolvimento de doenças inflamatórias, neurodegenerativas, cardiovasculares, enfraquecimento do sistema imunológico, diabetes e tumores (SIERRA et al., 2021).

Dentre os compostos antioxidantes mais conhecidos estão substâncias como pigmentos carotenoides (licopeno, β -carotenos), vitamina C e vitamina E, presentes em diversos alimentos como salmão, camarões e vegetais amarelados/avermelhados (pimentões, por exemplo), além das, frutas cítricas (NIRMALA et al., 2018). Para que o indivíduo consiga usufruir das propriedades benéficas do seu consumo, a suplementação com antioxidantes na alimentação muitas vezes é administrada. Além disto, antioxidantes sintéticos como hidroxitolueno butilado (BHT), hidroxianisol butilado (BHA), terc-butil-hidroquinona (TBHQ) e propilgalato (PG) são comumente adicionados a alimentos pela indústria a fim de minimizar a oxidação de alimentos e potencial toxicidade (LEÃO et al., 2017). No entanto, o consumo destas substâncias sintéticas pode trazer efeitos adversos para a saúde, fazendo-se necessário um controle rígido sobre o emprego desses produtos artificiais (PAN et al., 2016).

Por conta das conseqüências nocivas associadas ao uso de antioxidantes sintéticos, o segmento industrial tem se empenhado cada vez mais na busca de alternativas naturais que possam desempenhar a função antioxidante sem perda de efetividade comparada às opções tradicionais. Dentre estas, os peptídeos de colágeno têm se mostrado bem-sucedidos ao retirar radicais livres do organismo (prevenindo a oxidação dos lipídios poliinsaturados na membrana celular), regular os níveis dessas espécies reativas e auxiliar o sistema fisiológico de defesa (SONG et al., 2021; WU et al., 2018). A diversidade de fontes de peptídeos de colágeno de origem aquática com atividade antioxidante sendo estudadas atualmente são exemplificados na Tabela 1.

Tabela 1. Peptídeos de colágeno derivado de organismos aquáticos com atividade antioxidante.

Espécie	Resíduo	Método de hidrólise	Massa molar	Técnica	Ref.
Peixe-leite (<i>Chanos chanos</i>)	Escamas	Pepsina	< 3 kDa	Ensaio DPPH; Ensaio ABTS	Chen et al. (2018)
Tilápia do Nilo (<i>Oreochromis niloticus</i>)	Escamas	Papaína	*	Ensaio DPPH	Zeng et al. (2015)
Salmão (<i>Salmo salar</i>)	Pele	Protease de <i>Vibrio</i> sp.	< 3 kDa	Ensaio DPPH	Wu et al. (2018)
Paludo (<i>Thunnus obesus</i>)	Pele	Hidrólise hidrotérmica estática	< 1 kDa	Ensaio ABTS	Park & Jo (2019)
Tubarão-baleia (<i>Rhincodon typus</i>)	Cartilagem	Termolisina	37 kDa	Ensaio DPPH	Jeevithan et al. (2015)
Raia-lenga (<i>Raja clavata</i>)	Músculo	Proteases, alcalase, neutrase	85-3500 Da	- Ensaio DPPH	Lassoued et al. (2015)
Tilápia (<i>Oreochromis sp.</i>)	Escamas	Alcalase, Flavorzima	*	Ensaio ABTS	Sierra-Lopera and Zapata-Montoya (2021)
Raia grande (<i>Beringraja pulchra</i>)	Cartilagem	Tripsina; Quimotripsina; Papaína	<3 kDa	Ensaio DPPH; Ensaio ABTS	Li et al. (2021)
Camarão (<i>Penaeus notialis</i>)		Tripsina pancreática	150-550 Da	Ensaio DPPH	Montero et al. (2019)
Lula (<i>Loligo vulgaris</i>)	Pele	Alcalase	1–10 kDa	Ensaio ABTS	Nakchum and Kim (2016)
Lula gigante (<i>Dosidicus gigas</i>)	Pele	Pepsina, alcalase e esperase	≤ 75 kDa	Ensaio ABTS; RP-HPLC; Teste de disco-difusão em ágar	Mosquera et al. (2014)

*Informação não publicada pelo autor.

4.3 Quelante de ferro

O ferro é um dos mais importantes minerais no organismo animal, indispensável para a manutenção de funções biológicas como a hematopoiese, transporte do oxigênio pelo sangue e conservação de níveis saudáveis de hemoglobina. Além disso, o ferro é um dos componentes de enzimas vitais para o metabolismo celular e aprimora o funcionamento dos sistemas nervoso e imune (LIN et al., 2021). Atualmente, a deficiência de ferro é a “fome oculta” mais recorrente (MASUDA et al., 2020), ou seja, entre os micronutrientes (vitaminas e minerais), o ferro é aquele com a maior taxa de carência na população mundial, déficit este intimamente relacionado a prejuízos como anemia, danos ao metabolismo e ao desenvolvimento cognitivo e aumento da mortalidade infantil e materna. Estima-se que cerca de 20% da população mundial sofre de anemia relacionada a deficiência de ferro, sendo as crianças entre 0-5 anos, mulheres em idade fértil e idosos a população mais acometida (ZHANG; DINGLI, 2021).

A fim de combater a deficiência de ferro e seus riscos associados, diferentes tipos de suplementos foram desenvolvidos ao longo do tempo, pois muitas vezes apenas o ferro consumido na alimentação não é suficiente para suprir a demanda do organismo (WU et al., 2020). A primeira iniciativa nesse sentido foi o desenvolvimento e administração de sais ferrosos, porém, essas formulações acabaram caindo em desuso devido a sua baixa biodisponibilidade e consequente baixa absorção pelo organismo (ZHANG; DINGLI, 2021). Para solucionar esse problema, novos suplementos passaram a incluir complexos aminoácidos-íon ferroso, aumentando sua taxa de absorção. No entanto, o uso de aminoácidos torna a produção mais onerosa, além de levar a oxidação dos lipídios e perda da coloração dos alimentos (LIN et al., 2021; LUO et al., 2020).

Recentemente, a fortificação de alimentos com complexos peptídeos-íon ferrosos tem se mostrado mais vantajosa, devido a sua maior estabilidade, segurança, absorção, e biodisponibilidade em relação a suplementos anteriores, propiciando o transporte e absorção do ferro pelo intestino a partir dos mecanismos de absorção dos peptídeos (LUO et al., 2020). Para o desenvolvimento de suplementos mais eficientes, fontes proteicas aquáticas estão sendo investigadas como uma alternativa mais baratas e eficientes, como pele e escamas de diferentes espécies como: tilápia-do-nilo (*Oreochromis niloticus*) (LIN et al., 2021), polaca do Alasca (*Theragra*

chalcogramma) (GUO et al., 2015) e peixe-leite (*Chanos chanos*) (HUANG et al., 2015).

4.2 Cicatrizante

A pele é o maior órgão do corpo humano e tem importantes atribuições para a manutenção do organismo, que incluem a sua função sensorial e o seu papel como a primeira barreira física entre um organismo e o seu ambiente externo. Por ser um órgão de revestimento, a pele está constantemente em contato direto com substâncias nocivas, patógenos e variados poluentes. Por isso, embora sejam comuns, as lesões cutâneas implicam uma exposição do organismo, viabilizando a introdução de patógenos que podem colocar em risco o bem-estar e até mesmo a vida do indivíduo (MOHOLKAR et al., 2021).

Morfologicamente, a pele dos mamíferos é composta por 3 camadas: 1) epiderme: camada mais superficial, rica em queratina (95%); 2) derme: camada mediana, rica em colágeno (70%); 3) hipoderme: camada mais profunda, composta de tecido conjuntivo frouxo e gordura (MAYET et al., 2014). A depender da profundidade da camada atingida pela lesão (corte, queimadura, laceração), o processo cicatricial envolve diferentes etapas (inflamação, proliferação celular, remodelamento tecidual), que se tornam cada vez mais complexas, dinâmicas e, especialmente demoradas (MOHOLKAR et al., 2021).

Deve-se considerar o longo tempo despendido para a regeneração fisiológica da integridade do tecido cutâneo como um fator-chave que pode tornar os pacientes mais suscetíveis a complicações, sendo a mais comum entre elas o risco de infecções (SUN et al., 2021). Por isso, tradicionalmente, o tratamento de lesões na pele se apoia fortemente na administração de antibióticos orais e tópicos, o que, embora coerente, causa desconforto para o paciente, além de agregar o risco de desenvolvimento de resistência a esses medicamentos, o que é especialmente danoso àqueles pacientes com ferimentos crônicos que necessitam de tratamento prolongado (HAN & CEILLEY, 2017). Desta forma, é incentivada a busca por outras vias visando aumentar o bem-estar dos indivíduos, assim como minimizar os riscos e acelerar o processo cicatrizante.

O desenvolvimento de curativos é um tópico de muito interesse para os campos da medicina e da farmacologia, e, ao longo do tempo, diferentes polímeros naturais como o alginato (VARAPRASAD et al., 2020), a quitosana (NEŠOVIĆ et al., 2019), a seda (PATIL; REAGANBOHARA, 2020), o ácido hialurônico (GRAÇA et al., 2020) e o colágeno (DU et al., 2021) têm sido propostos como materiais viáveis para a composição de curativos e na engenharia de tecidos. Entre estes, o colágeno desponta como um dos mais atrativos, pois além de uma boa compatibilidade, também apresenta baixa antigenicidade comparado aos outros biopolímeros (LIN et al., 2019). Sendo assim, formulações como hidrogéis, esponjas, filmes, membranas e fibras baseadas em colágeno são extensivamente estudadas e aplicadas, garantindo uma permeabilidade adequada (permitindo trocas gasosas), proteção antimicrobiana e aceleração da cicatrização sem a presença de efeitos citotóxicos (MOHOLKAR et al., 2021).

A partir da experiência bem-sucedida com a utilização do colágeno como um aliado na proteção de ferimentos e aceleração do processo de cicatrização (LAKRA; KIRANSAI KORRAPATI, 2022), os peptídeos obtidos através de sua hidrólise também despertam interesse quanto ao seu potencial cicatrizante, assim como suas possíveis vias de ação. Ao contrário da estrutura resistente característica do colágeno, os peptídeos podem ser mais facilmente digeridos, absorvidos e transportados por todo o organismo, encontrando seu alvo e desempenhando sua bioatividade de forma mais específica (LIN et al., 2021). Quando em contato com uma lesão cutânea, os peptídeos sinalizam uma falsa degradação do colágeno, o que estimula os fibroblastos a sintetizar mais colágeno, imprescindível nos processos de remodelação tecidual e reepitelização durante a cicatrização (FELICIAN et al., 2019). Essas evidências tornam claro o potencial desses hidrolisados como agentes significativos no tratamento de lesões, minimizando consequentes riscos e melhorando a qualidade de vida dos pacientes. Exemplos de fontes aquáticas de colágeno recentemente estudadas para a obtenção de peptídeos com atividade cicatrizante estão reunidos na Tabela 2.

Tabela 2. Peptídeos de colágeno derivado de organismos aquáticos com propriedades cicatrizantes.

Espécie	Resíduo	Método de hidrólise	Massa molar	Técnica	Ref.
Tilápia do Nilo (<i>Oreochromis niloticus</i>)	Pele	Digestão por <i>Clostridium histolyticum</i>	960–1970 Da	Ensaio de proliferação celular	Felician et al. (2019)
Polaca do Alasca (<i>T. chalcogramma</i>)	Pele	Alcalase	430–1000 Da	Experimentação <i>in vivo</i> usando ratos Sprague-Dawley	Yang et al. (2018)
Medusa (<i>Rhopilema esculentum</i>)	*	Colagenase II, papaína e proteinase alcalina	< 25 kDa	Análise de migração celular	Shang et al. (2020)

*Informação não publicada pelo autor.

4.5 Atividade Antimicrobiana

A resistência microbiana aos antibióticos convencionais é apontada pela Organização Mundial da Saúde (OMS) como uma das principais ameaças à saúde pública, derivado de um longo histórico de uso indiscriminado desses medicamentos dentro dos sistemas de saúde, na produção agropecuária e indústria alimentícia e pela população em geral (LUONG; THANH; TRAN, 2020). Cerca de 700.000 óbitos no mundo são causados por infecções por bactérias resistentes a antibióticos todos os anos, e estima-se que caso essa questão não seja solucionada, até 2050 esse número pode chegar até 10 milhões de óbitos anuais (PFALZGRAFF; BRANDERBURG; WEINDL, 2018), levantando questionamentos sobre uma possível “era pós-antibióticos” devido a perda de eficácia desses medicamentos (KWON; POWDERLY, 2021).

Os agentes antimicrobianos mais comuns podem ser agrupados em categorias distintas, baseado em seu mecanismo de ação: (1) inibidores de síntese de parede celular; (2) despolarizadores de membrana celular; (3) inibidores de síntese de proteínas; (4) inibidores de síntese de ácidos nucleicos; e, (5) disruptores de vias

metabólicas (REYGAERT, 2018). No entanto, apesar da larga variedade de drogas disponíveis, a administração indiscriminada de tais medicamentos é a grande responsável pela crescente problemática da resistência microbiana. Para evitar o aumento da severidade do problema, diversos esforços foram lançados na tentativa de restringir o acesso a antibióticos, no entanto, apenas o controle do uso dos medicamentos já existentes não é o suficiente (TANG et al., 2015), fazendo-se necessário o desenvolvimento de novas drogas para o combate a infecções. Nesse contexto, peptídeos antimicrobianos são propostos como uma nova ordem de agentes de largo espectro contra organismos resistentes a antibióticos, com vias de ação antimicrobiana diferentes dos medicamentos tradicionais, além de inibir a formação de biofilmes e induzir a dissolução de biofilmes já formados (DE SOUZA et al., 2021; WANG et al., 2021; LÁZÁR et al., 2018).

Sabe-se que a atividade dos peptídeos antimicrobianos se dá pela sua adesão à membrana plasmática e consequente disruptura das células-alvo (ABDILLAH I et al., 2018), porém, diferentes modelos de vias específicas são propostos, sendo os mais comuns, o modelo de “carpete”, o modelo de “detergente”. No primeiro modelo, os peptídeos tendem a se agrupar e revestir a superfície da membrana bacteriana, interferindo sobre a estabilidade da bicamada lipídica e aumentando a sua permeabilidade. Já no segundo modelo, com o aumento da concentração de peptídeos na membrana, sua permeabilização e desintegração se intensifica, levando à formação de micelas, como observado na ação de detergentes (WIMLEY, 2010).

Na perspectiva da utilização de peptídeos antimicrobianos do tratamento de infecções, os peptídeos de fontes aquáticas representam uma opção altamente viável e eficiente, como demonstrado em estudos avaliaram a atividade antimicrobiana de peptídeos produzidos a partir pele de patudo (*Thunnus obesus*) (Ahmed & Chun, 2018), pele de lula-gigante (*Dosidicus gigas*) e até mesmo águas residuais de cozimento de anchovas (*Engraulis japonicus*) (TANG et al., 2015) (Tabela 3).

Tabela 3. Peptídeos de colágeno derivado de organismos aquáticos com atividade antimicrobiana.

Espécie	Resíduo	Método de hidrólise	Massa molar	Técnica	Ref.
Patudo (<i>Thunnus obesus</i>)	Pele	Hidrólise subcrítica	< 600 Da	Teste de disco-difusão em ágar Ensaio ABTS;	Ahmed & Chun (2018)
Lula gigante (<i>Dosidicus gigas</i>)	Pele	Pepsina, alcalase e esperase	≤ 75 kDa	RP-HPLC; Teste de disco-difusão em ágar	Mosquera et al. (2014)
Anchova (<i>Engraulis japonicus</i>)	Água residual de cozimento	Protamex	1104 Da	Análise de diluição em microcaldo	Tang et al. (2015)

*Informação não publicada pelo autor.

4.6 Anti-adipogênico

A obesidade é uma condição metabólica patológica complexa, muitas vezes associada a mudanças nas características funcionais e morfológicas dos adipócitos, o que se manifesta no acúmulo excessivo de tecido adiposo branco (AHN; JE, 2021). Atualmente, a obesidade é considerada uma epidemia, com sua prevalência triplicando nas últimas décadas e se aproximando de uma taxa de 20% da população global (GÓMEZ et al., 2021). Este aumento é especialmente preocupante devido à conexão da condição com outras doenças crônicas, como diabetes, hipertensão, doenças cardiovasculares, câncer e inflamações (KUMAR, 2019).

A adipogênese é um processo multifatorial que demanda a ativação sequencial e ordenada de 2 principais fatores de transcrição adipogênicos: o receptor ativado por proliferadores de peroxissoma (*peroxisome proliferator-activated receptor-γ*, PPAR-γ) e as proteínas ligantes ao amplificador CCAAT (*CCAAT/enhancer binding proteins*, C/EBPs) (AHN; JE, 2021). Tais fatores, ao regularem a expressão de genes-alvo,

estimulam a diferenciação e manutenção dos adipócitos. Por sua vez, adipócitos maiores e em maior quantidade levam a um maior acúmulo de lipídios e liberação de citocinas e adipocinas pró-inflamatórias, gerando os riscos associados à obesidade (FUGGETTA et al., 2019). A investigação dos peptídeos de colágeno de fonte aquática como agentes anti-adipogênicos ainda é recente, porém, os resultados obtidos até então auxiliam na elucidação da função dos peptídeos de colágeno dentro do mecanismo complexo da adipogênese e como esses compostos podem servir como tratamentos adjuvantes no tratamento da obesidade e na melhoria da qualidade de vida de pacientes (LEE et al., 2017).

Testes realizados com ratos alimentados com dietas ricas em gordura concluem que a ingestão de peptídeos de colágeno reprime a expressão dos genes responsáveis por C/EBPs e PPAR- γ na fase de diferenciação dos adipócitos. Esse efeito resulta na diminuição do tamanho e proliferação dos adipócitos e redução do ganho de peso nos animais submetidos ao teste, independente da dieta, além de auxiliar na redução de taxas de colesterol total e triglicérides (LEE et al., 2017). Outro fator relevante à complexidade da patologia da obesidade é a constituição da microbiota intestinal. A administração desses peptídeos também tem efeitos benéficos sobre a restauração da microbiota intestinal saudável dos animais, diminuindo a incidência de bactérias causadoras de inflamação, condição prevalente entre pacientes obesos (WANG et al., 2020). Dessa forma, através da progressão dos estudos sobre a interação dos peptídeos de colágeno e de diferentes fatores influentes no desenvolvimento da obesidade, cada vez mais alternativas para o tratamento dessa condição estão sendo propostas.

5. Tendências de mercado e abordagem bibliométrica

O volume de produção científica acerca da utilização de peptídeos biologicamente ativos tem sido cada vez maior. Conhecer, mapear e filtrar as informações de acordo com o interesse industrial tem se tornado outro grande desafio. Apesar de ser uma iniciativa recente, a análise bibliométrica tem se mostrado uma rica oportunidade de estudo, ao apurar as tendências emergentes de publicação dentro de uma área do conhecimento, assim como examinar a produção científica cumulativa de países, instituições e autores acerca do tópico de interesse (DONTHU et al., 2021), através de uma análise quantitativa e qualitativa da literatura disponível. De fato,

análises bibliométricas já foram feitas em campos diversos, passando pelas áreas de marketing digital (FARUK; RAHMANHASAN, 2021), economia (MURDAYANTIKHAN, 2021), educação (BEHL et al., 2022) e até de biotecnologia (MÖRSCHBÄCHER; GRANADA, 2022; GONÇALVES et al., 2019), o que evidencia a versatilidade desse tipo de análise. No entanto, até o presente momento, ainda não há relatos científicos de uma análise bibliométrica para avaliar o estado atual e tendências das pesquisas dentro do campo dos peptídeos com ênfase nos obtidos a partir do colágeno de fontes aquáticas.

5.1 Resultados e discussão

A partir da busca realizada direcionada para análise bibliométrica, foram selecionados 36 documentos, sendo 33 (96,1%) artigos científicos e 3 (8,33%) artigos de revisão. Apesar das condições de busca possibilitarem a inclusão de documentos publicados desde o ano 2000, os resultados obtidos demonstram que a atenção foi apenas recentemente voltada para a utilização de fontes aquáticas para a obtenção de peptídeos de colágeno, com suas primeiras publicações datadas no ano de 2010 (6 publicações) (Figura 3). Após 2010, é notável a variação do número de publicações na área, com uma queda acentuada nos anos seguintes e restabelecimento de uma maior quantidade de publicações já nos anos de 2020 e 2021, com 5 publicações cada.

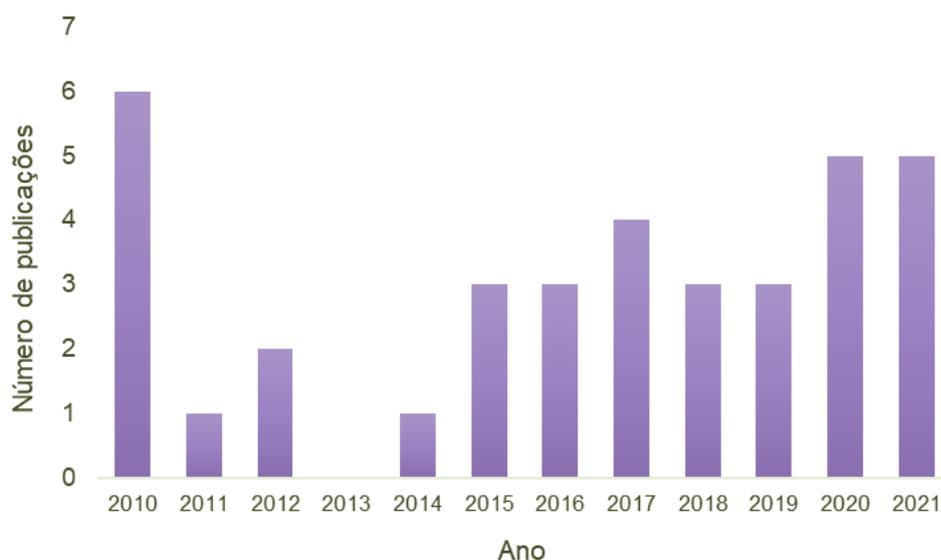


Figura 3. Número de artigos científicos publicados sobre peptídeos de colágeno de origem aquática por ano.

Ao observar a distribuição geográfica das publicações selecionadas, 14 países têm participação na literatura específica disponível sobre o tema. Ademais, confirma-se a dominância de países asiáticos e europeus nesse campo de investigação, o que é justificado por seu amplo mercado para esse tipo de produto (*Mordor Intelligence*, 2022). Dos 36 documentos selecionados, 25 (69,4%) foram publicados por autores da China, enquanto países como Itália, Coreia do Sul, Alemanha, Japão, Índia, Iran, Grécia e Brasil têm participações mais discretas no total de publicações.

Os *clusters* formados pelo *software VOSviewer* a partir dos dados bibliométricos da pesquisa confirmam essa tendência, além de demonstrarem padrões de colaboração entre países. Na Figura 4, estão elencados os países com maior representatividade na pesquisa sobre peptídeos de colágeno de origem aquática. O tamanho dos círculos é proporcional à quantidade de publicações de cada território e as linhas representam uma relação de colaboração entre os países.

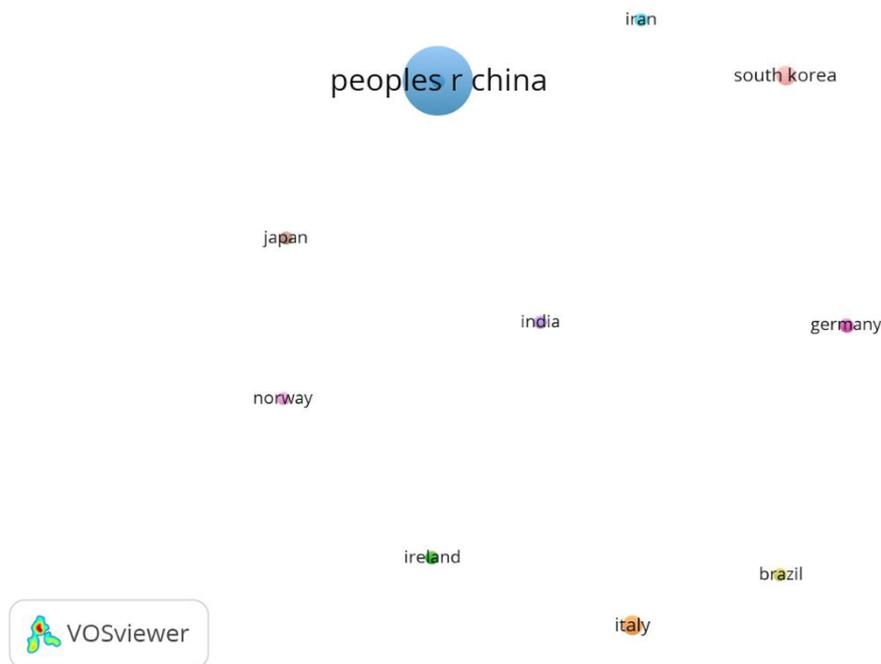


Figura 4. Países com contribuições para a literatura específica sobre peptídeos de colágeno aquático.

A partir dos *clusters* obtidos, fica claro que uma rede forte de colaboração entre países ainda não está estabelecida. Na literatura, observa-se que mesmo em trabalhos colaborativos, tais parcerias ainda tendem a serem realizadas entre instituições/pesquisadores dentro de um mesmo território/região (JIANG; BHAT; LAM,

2020). O *software* permite ainda a aproximação da imagem, onde torna-se possível observar algumas colaborações discretas entre a China e a Espanha e entre a Irlanda e a Irlanda do Norte (Figura 5), o que reforça ainda mais a hegemonia asiática/europeia ainda presente nesse campo de investigação.



Figura 5. Países que estabeleceram parcerias em suas publicações.

Como previsto pela prevalência de estudos provindos do território chinês, ao destacar as principais organizações atuantes na pesquisa sobre produção e aplicação de peptídeos de colágeno, visualizamos que dentre as 53 organizações listadas, as instituições chinesas são as grandes líderes na área, especialmente a Universidade de Pequim (15 documentos, 376 citações) e outras instituições de ensino superior e institutos de pesquisa médica e tecnológica do país (Figura 6). Com a produção mais robusta entre todas as organizações listadas, a Universidade de Pequim também é a instituição com maior número de colaborações com outras instituições, especialmente a Academia de Medicina e Ciência de Shandong e a Universidade de Ciência e Tecnologia de Pequim. No cenário brasileiro, 2 centros acadêmicos federais (Universidade Federal de Viçosa (UFV) e a Universidade Federal de Alfenas (UNIFAL)), estão listados, com 1 documento cada.

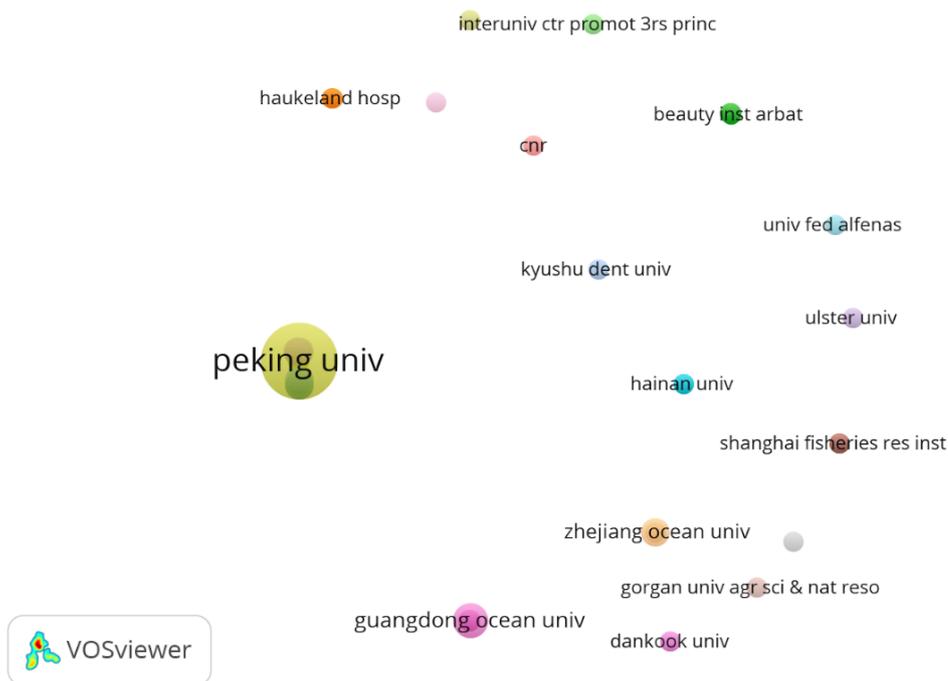


Figura 6. Organizações com maior número de publicações sobre peptídeos de colágeno aquático.

A análise de co-autoria permite a elucidação do grau de colaboração entre diferentes autores. Na presente pesquisa, sem qualquer restrição acerca do número mínimo de publicações, um total de 156 autores foram localizados, distribuídos em 24 grupos distintos. Na Figura 7, é clara a separação entre grupos de pesquisa de países distintos, reforçando a fragilidade ainda presente nas redes de colaboração internacional entre pesquisadores dentro da área de peptídeos de colágeno aquático, com alguns grupos isolados de pesquisadores europeus e outros de pesquisadores asiáticos, sendo os últimos os responsáveis pela maior rede de coautoria dentro da área.

Restringindo a pesquisa àqueles autores com mais de 4 publicações, obtemos 5 nomes principais: Li Y., Zhang F., Wang J., Zhang Z. e Zhao M. Todos os principais autores da área estão presentes no maior *cluster* ilustrado na Figura 7, e têm uma relação próxima de parceria entre si.

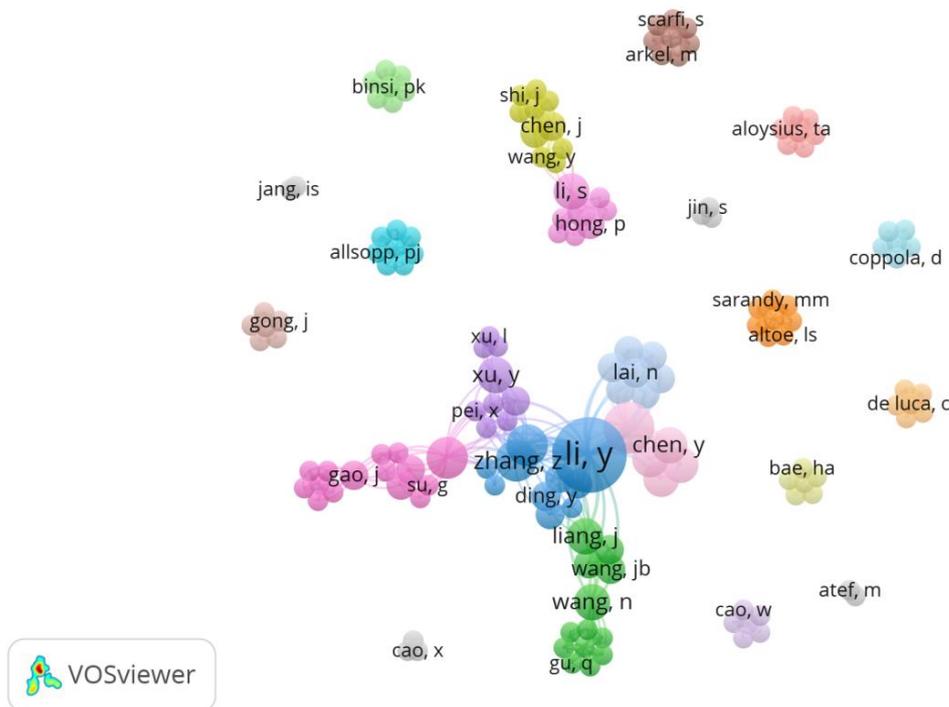


Figura 7. Panorama geral de co-autoria.

A análise de co-ocorrência de palavras-chaves se torna relevante ao indicar os pontos temáticos centrais nas pesquisas da área de interesse. Além disso, esse tipo de investigação também é capaz de apontar possíveis futuras tendências de pesquisa (BRETAS; ALON, 2021). A restrição da pesquisa quanto a um número mínimo alto de ocorrências adiciona uma limitação temporal aos resultados, visto que vias inovadoras de investigação podem ainda não ter um contingente significativo de trabalhos publicados. Por isso, para que iniciativas de pesquisa mais recentes e menos representadas também fossem incluídas, a busca foi realizada de modo a abranger termos que ocorressem pelo menos 2 vezes entre os documentos selecionados.

Além disso, a fim de elucidar a trajetória das tendências de pesquisa dentro do tema ao longo do tempo, o modo de visualização “*Overlay*” foi selecionado. Nesse tipo de visualização, os círculos e traços mais escuros representam as palavras-chaves presentes nos trabalhos mais antigos, ou seja, os temas mais tradicionalmente explorados. Por outro lado, os círculos e traços mais claros, representam as palavras-chaves utilizadas mais recentemente, ou seja, os temas que vêm sendo estudados

com frequência nos últimos anos. A rede resultante da seleção está representada na Figura 8.

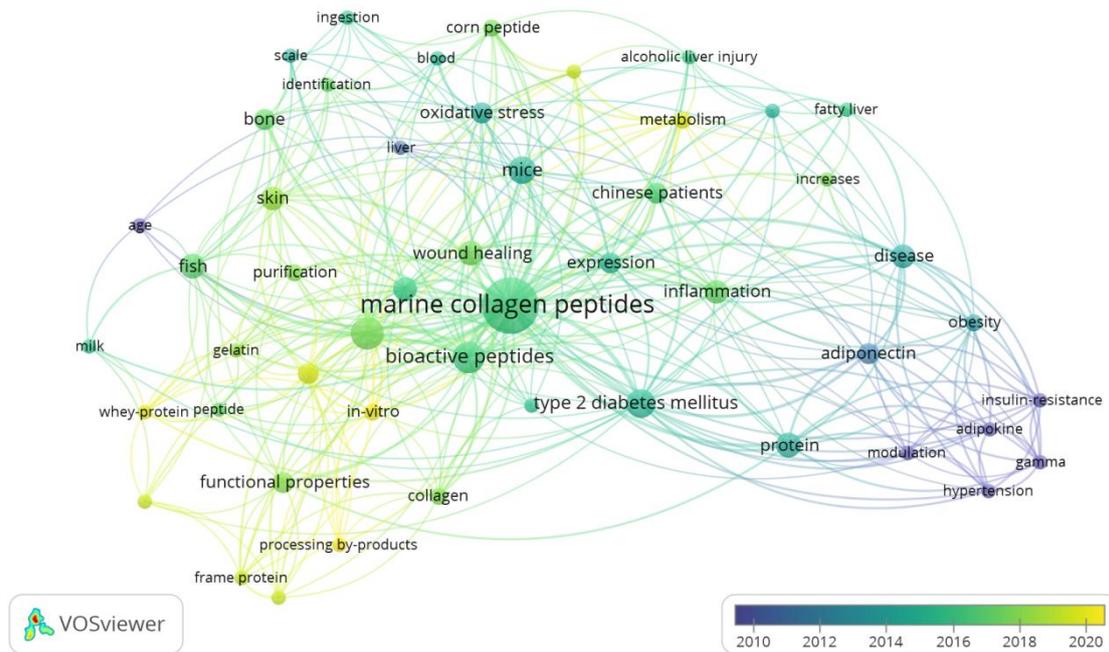


Figura 8. Rede de palavras-chaves relevantes para o tema (Representação *Overlay*).

Como pode-se observar na imagem, termos relacionados às atividades anti-hipertensiva, anti-adipogênica e ao controle do diabetes tipo 2, vêm sendo utilizados desde o início das publicações envolvendo peptídeos de colágeno aquático. Com o passar dos anos, outras bioatividades passaram a ser mais estudadas, como a atividade anti-inflamatória, antioxidante e cicatrizante, assim como a exploração de fontes diversas para a obtenção do colágeno, como pele, ossos e escamas de peixe. Dentre as palavras-chaves mais utilizadas recentemente (em amarelo), está o termo “*processing by-product*” (subprodutos do processamento), cujo aproveitamento é uma vertente crescente de pesquisa nos últimos anos (ZAMORANO-APODACA et al., 2020).

Subprodutos da indústria pesqueira são excelentes fontes de colágeno. De todo o pescado capturado mundialmente, cerca de 25% são convertidos em subprodutos que comumente são descartados após o processamento (FAO, 2018). O processo de filetagem de peixes, especificamente, transforma cerca de 70% do peso total do pescado em resíduos que não são destinados ao consumo, como vísceras,

ossos, pele, escamas, cabeça, etc, causando impacto ambiental e desperdício de uma matéria-prima rica em biomoléculas (VÄLIMAA et al., 2019). Nesse contexto, nos últimos anos, esses resíduos têm sido alvos de interesse quanto ao seu potencial como fonte de biomoléculas de interesse para diversos segmentos industriais, como o colágeno, cuja hidrólise resulta na produção de diversos peptídeos bioativos que podem ser empregados em formulações benéficas para a saúde e bem-estar humano e animal (NURILMALA et al., 2021).

Diante da análise bibliométrica realizada, ficou evidente o protagonismo dos países asiáticos e europeus na área de peptídeos de organismos aquáticos. Isto ocorre devido sua localização geográfica, as populações dos países asiáticos próximos ao oceano Pacífico têm uma longa tradição de consumo de organismos aquáticos na alimentação, estabelecendo o consumo desses alimentos como elementos culturais significativos para esses povos (LIPOETO; GEOK LINANGELES-AGDEPPA, 2012) e tornando a indústria pesqueira dessas regiões cada vez mais lucrativa, ano após ano (MARKET RESEARCH, 2022). Arelado a alta produtividade dessa indústria, está alta disponibilidade de seus subprodutos, que, em conjunto com a tecnologia disponível, faz desses territórios grandes produtores de peptídeos de colágeno.

As regiões com maior produção e mercado para peptídeos de colágeno ditam as tendências globais para esse segmento. Os consumidores asiáticos, europeus e norte-americanos têm demonstrado um crescente interesse por nutracêuticos, suplementos e alimentos fortificados de origem ética, o que tem levado ao desenvolvimento de produtos que utilizam colágeno de pele de peixe e outros resíduos pesqueiros como fonte (GLOBAL MARKET INSIGHTS, 2021). A Tabela 4 evidencia a amplitude comercial do ramo de peptídeos de colágeno, assim como suas aplicações.

Tabela 4. Empresas que operam no mercado global de peptídeos de colágeno.

Empresa	País	Ramo/Produto
Tessengerlo Group® (www.tessengerlo.com)	Bélgica	Alimentos para pets e animais aquáticos
Gelita AG® (www.gelita.com/en/products-and-brands)	Alemanha	Suplementos alimentares; produtos farmacêuticos; alimentação animal; especialidades (lubrificantes, detergentes etc.)
Darling Ingredients® (www.darlingii.com/)	EUA	Suplementos nutracêuticos direcionados ao fortalecimento de ossos e articulações e melhoria da textura e aparência geral da pele.
Holista CollTech® (www.holistaco.com/our-products.html)	Austrália	Suplementos alimentares para fortalecimento dos ossos; alimentos e bebidas funcionais; cosméticos (loções, máscaras faciais, produtos capilares).
Nitta Gelatin® (wellnex-collagen.com/)	Japão	Suplementos alimentares; alimentos e bebidas funcionais; cosmeceuticos; nutricosméticos.
Collagen Solution® (www.collagensolutions.com/)	Reino Unido	Materiais de uso médico (soluções, pó) e engenharia de tecidos.
Amicogen Inc. ® (amicogen.com/en/)	Coréia do Sul	Suplementos destinados a cuidados pessoais/embelezamento.

Quando se avaliam mercado que utiliza como matéria-prima a base de peixes para a obtenção de peptídeos, destacam-se: Capsugel Belgium NV, GELITA AG, Amicogen Inc., Nitta Gelatin, In., Norland Products, Inc., Vivesa Holding S.R.O., Rousselot e Hangzhou Nutrition Biotechnology Co., Ltd. O aumento da expectativa de vida e consequente envelhecimento da população é um fator que contribui para o aumento e manutenção de uma alta demanda para esse tipo de produto. Atrelado a isso, é notável o uso de peptídeos de colágeno de peixe como uma opção mais segura em relação aos derivados de animais terrestres em formulações da indústria cosmética e de embelezamento, devido a suas funcionalidades anti-envelhecimento e hidratantes (ZHAO; ZHANG; LIU, 2021). Assim, o crescimento das indústrias farmacêutica,

nutracêutica e cosmética em todo o mundo tendem a aquecer igualmente o mercado de peptídeos de colágeno de peixe (Park & Jo, 2019), sinalizando a importância deste produto na economia global.

6. Considerações Finais

Diante dos pontos abordados na presente revisão e estudo bibliométrico, fica evidenciada a importância da investigação acerca da produção, aplicações e mercado global atual de peptídeos de colágeno derivados de organismos aquáticos. Tendo em vista que se trata de um segmento relativamente novo e em constante expansão. A partir dos dados bibliométricos analisados, é inquestionável o protagonismo do território asiático e europeu no panorama global de produção e comercialização de peptídeos de colágeno de origem aquática, resultado do acesso desses territórios a investimentos na área, que garantem acesso às mais avançadas tecnologias disponíveis.

Além disso, destaca-se a colaboração ainda restrita entre grupos e intuições de pesquisa, frequentemente limitada a pesquisadores de um mesmo país ou países vizinhos. Por isso, faz-se necessário que a expansão do estudo sobre peptídeos aquáticos seja acompanhada pelo estabelecimento de uma rede global de colaboração entre pesquisadores. Ainda, considera-se que análises bibliométricas como a do presente trabalho são de necessidade constante, para que haja um acompanhamento das mudanças no panorama que envolve o estudo e o mercado de peptídeos de colágeno aquático ao longo do tempo.

7. REFERÊNCIAS

- ABDILLAHI, S. et al. Collagen VI Contains Multiple Host Defense Peptides with Potent In Vivo Activity. **The Journal of Immunology**, v. 201, n. 3, p. 1007-1020, 2018.
- ALI, A.; KISHIMURA, H.; BENJAKUL, S. Extraction efficiency and characteristics of acid and pepsin soluble collagens from the skin of golden carp (*Probarbus Jullieni*) as affected by ultrasonication. **Process Biochemistry**, v. 66, p. 237-244, 2018.
- AHMED, M.; VERMA, A.; PATEL, R. Collagen extraction and recent biological activities of collagen peptides derived from sea-food waste: A review. **Sustainable Chemistry and Pharmacy**, v. 18, Artigo. 100315, 2020.
- 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.
- AKITA, M.; NISHIKAWA, Y.; SHIGENOBU, Y.; AMBE, D.; MORITA, T.; MORIOKA, K.; ADACHI, K. Correlation of proline, hydroxyproline and serine content, denaturation temperature and circular dichroism analysis of type I collagen with the physiological temperature of marine teleosts. **Food Chemistry**, v. 329, Artigo. 126775, 2020.
- ALEMÁN, A.; GÓMEZ-GUILLÉN, M.; MONTERO, P. Identification of ace-inhibitory peptides from squid skin collagen after in vitro gastrointestinal digestion. **Food Research International**, v. 54, n. 1, p. 790-795, 2013.
- BEHL, A. et al. Gamification and e-learning for young learners: A systematic literature review, bibliometric analysis, and future research agenda. **Technological Forecasting and Social Change**, v. 176, p. 121445, 2022.
- BRETAS, V.; ALON, I. Franchising research on emerging markets: Bibliometric and content analyses. **Journal of Business Research**, v. 133, p. 51-65, 2021.
- CHEN, J.; CHAO, F.; MU, X.; JIANG, J.; ZHU, Q.; REN, J.; GUO, Y.; LOU, Y. ZnIn₂S₄/UiO-66-(SH)₂ composites as efficient visible-light photocatalyst for RhB degradation. **Inorganic Chemistry Communications**, v. 102, p. 25-29, 2019.
- CHEN, J.; SUN, S.; LI, Y.; LIU, R. Proteolysis of tilapia skin collagen: Identification and release behavior of ACE-inhibitory peptides. **LWT**, v. 139, Artigo. 110502, 2021.
- CHEN, Y.; LIANG, C.; WU, H.; PANG, H.; CHEN, C.; WANG, G.; CHAN, L. Antioxidant and anti-inflammatory capacities of collagen peptides from milkfish (*Chanos chanos*) scales. **Journal of Food Science and Technology**, v. 55, n. 6, p. 2310-2317, 2018.
- CHENG, Y., LU, S., HU, Z., ZHANG, B., LI, S.; HONG, P. Marine collagen peptide grafted carboxymethyl chitosan: Optimization preparation and coagulation evaluation. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 164, p. 3953-3964, 2020.
- Collagen Peptide Market | 2022 - 27 | Industry Share, Size, Analysis. Disponível em: <<https://www.mordorintelligence.com/industry-reports/collagen-peptide-market>>. Acesso em: 16 maio. 2022.
- DAVE, D.; LIU, Y.; CLARK, L.; DAVE, N.; TRENHOLM, S.; WESTCOTT, J. Availability of marine collagen from Newfoundland fisheries and aquaculture waste resources. **Bioresource Technology Reports**, v. 7, Artigo. 100271, 2019.
- DONTHU, N. et al. How to conduct a bibliometric analysis: An overview and guidelines. **Journal of Business Research**, v. 133, p. 285-296, 2021.

- ENNAAS, N.; HAMMAMI, R.; BEAULIEU, L.; FLISS, I. Production of antibacterial fraction from Atlantic mackerel (*Scomber scombrus*) and its processing by-products using commercial enzymes. **Food and Bioproducts Processing**, v. 96, p. 145-153, 2015.
- ENNAAS, N.; HAMMAMI, R.; GOMAA, A.; BÉDARD, F.; BIRON, É.; SUBIRADE, M.; BEAULIEU, L.; FLISS, I. Collagencin, an antibacterial peptide from fish collagen: Activity, structure and interaction dynamics with membrane. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 473, n. 2, p. 642-647, 2016.
- FARUK, M.; RAHMAN, M.; HASAN, S. How digital marketing evolved over time: A bibliometric analysis on scopus database. **Heliyon**, v. 7, n. 12, p. e08603, 2021.
- FELICIAN, F. F.; YU, R.; LI, M.; LI, C.; CHEN, H.; JIANG, Y.; TANG, T.; QI, W.; XU, H. The wound healing potential of collagen peptides derived from the jellyfish *Rhopilema esculentum*. **Chinese Journal of Traumatology**, v. 22, n. 1, p. 12-20, 2019.
- FERRARIO, C.; LEGGIO, L.; LEONE, R.; DI BENEDETTO, C.; GUIDETTI, L.; COCCÈ, V.; ASCAGNI, M.; BONASORO, F.; LA PORTA, C. A.; CANDIA CARNEVALI, M. D.; SUGNI, M. Marine-derived collagen biomaterials from echinoderm connective tissues. **Marine Environmental Research**, v. 128, p. 46-57, 2017.
- GONÇALVES, M. et al. Trends on enzyme immobilization researches based on bibliometric analysis. **Process Biochemistry**, v. 76, p. 95-110, 2019.
- GUO, L.; HARNEDY, P. A.; O'KEEFFE, M. B.; ZHANG, L.; LI, B.; HOU, H.; FITZGERALD, R. J. Fractionation and identification of Alaska pollock skin collagen-derived mineral chelating peptides. **Food Chemistry**, v. 173, Article. 536-542, 2015.
- GSTÖTTNER, C.; KLEMM, D.; HABERGER, M.; BATHKE, A.; WEGELE, H.; BELL, C.; KOPF, R. Fast and Automated Characterization of Antibody Variants with 4D HPLC/MS. **Analytical Chemistry**, v. 90, n. 3, p. 2119-2125, 2018.
- HAN, S.; WON, B.; YANG, S.; KIM, D. *Asterias pectinifera* derived collagen peptide-encapsulating elastic nanoliposomes for the cosmetic application. **Journal of Industrial and Engineering Chemistry**, 2021.
- HONG, H.; FAN, H.; ROY, B. C.; WU, J. Amylase Enhances Production of Low Molecular Weight Collagen Peptides from the Skin of Spent Hen, Bovine, Porcine, and Tilapia. **Food Chemistry**, Artigo. 129355, 2021.
- HUANG, C.; KUO, J.; WU, S.; TSAI, H. Isolation and characterization of fish scale collagen from tilapia (*Oreochromis* sp.) by a novel extrusion–hydro-extraction process. **Food Chemistry**, v. 190, p. 997-1006, 2016.
- HUANG, C.; WU, C.; YANG, J.; LI, Y.; KUO, J. Evaluation of iron-binding activity of collagen peptides prepared from the scales of four cultivated fishes in Taiwan. **Journal of Food and Drug Analysis**, v. 23, n. 4, p. 671-678, 2015.
- JEEVITHAN, E.; BAO, B.; ZHANG, J.; HONG, S.; WU, W. Purification, characterization and antioxidant properties of low molecular weight collagenous polypeptide (37 kDa) prepared from whale shark cartilage (*Rhincodon typus*). **Journal of Food Science and Technology**, v. 52, n. 10, Article. 6312-6322, 2015.
- JIANG, C.; BHAT, C. R.; LAM, W. H. K. A bibliometric overview of Transportation Research Part B: Methodological in the past forty years (1979–2019). **Transportation Research Part B**, v. 138, p. 268-291, 2020.

JIANG, S.; ZHAO, Y.; SHEN, Q.; ZHU, X.; DONG, S.; LIU, Z.; WU, H.; ZENG, M. Modification of ACE-inhibitory peptides from *Acaudina molpadioidea* using the plastein reaction and examination of its mechanism. **Food Bioscience**, v. 26, p. 1-7, 2018.

KWON, J.; POWDERLY, W. The post-antibiotic era is here. **Science**, v. 373, n. 6554, p. 471-471, 2021.

LASSOUED, I.; MORA, L.; NASRI, R.; AYDI, M.; TOLDRÁ, F.; ARISTOY, M.; BARKIA, A.; NASRI, M. Characterization, antioxidative and ACE inhibitory properties of hydrolysates obtained from thornback ray (*Raja clavata*) muscle. **Journal of Proteomics**, v. 128, p. 458-468, 2015.

LÁZÁR, V.; MARTINS, A.; SPOHN, R.; DARUKA, L.; GRÉZAL, G.; FEKETE, G.; SZÁMEL, M.; JANGIR, P. K.; KINTSES, B.; CSÖRGŐ, B.; NYERGES, Á.; GYÖRKEI, Á.; KINCSES, A.; DÉR, A.; WALTER, F. R.; DELI, M. A.; URBÁN, E.; HEGEDŰS, Z.; OLAJOS, G.; MÉHI, O.; BÁLINT, B.; NAGY, I.; MARTINEK, T. A.; PAPP, B.; PÁL, C. Antibiotic-resistant bacteria show widespread collateral sensitivity to antimicrobial peptides. **Nature Microbiology**, v. 3, n. 6, p. 718-731, 2018.

Leão, L. L., Oliveira, F. S., Souza, R. S., Farias, P. K. S., Fonseca, F. S. A., Martins, E. R., & Souza, R. M.. (2017). Uso de antioxidantes naturais em carnes e seus subprodutos. **Caderno De Ciências Agrárias**, 9(1), 94–100.

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

LEÓN-LÓPEZ, A.; MORALES-PEÑALOZA, A.; MARTÍNEZ-JUÁREZ, V. M.; VARGAS-TORRES, A.; ZEUGOLIS, D. I.; AGUIRRE-ÁLVAREZ, G. Hydrolyzed Collagen—Sources and Applications. **Molecules**, v. 24, n. 22, Article. 4031, 2019.

LI, C.; SONG, W.; WU, J.; LU, M.; ZHAO, Q.; FANG, C.; WANG, W. PARK, Y.; QIAN, G. Thermal stable characteristics of acid- and pepsin-soluble collagens from the carapace tissue of Chinese soft-shelled turtle (*Pelodiscus sinensis*). **Tissue and Cell**, v. 67, Article. 101424, 2020.

LI, P.; LU, W.; CHAN, Y.; KO, W.; JUNG, C.; LE HUYNH, D. T.; JI, Y. Extraction and characterization of collagen from sea cucumber (*Holothuria cinerascens*) and its potential application in moisturizing cosmetics. **Aquaculture**, v. 515, Artigo. 734590, 2020.

LI, W.; KOBAYASHI, T.; MENG, D.; MIYAMOTO, N.; TSUTSUMI, N.; URA, K.; TAKAGI, Y. Free radical scavenging activity of type II collagen peptides and chondroitin sulfate oligosaccharides from by-products of mottled skate processing. **Food Bioscience**, v. 41, p. 100991, 2021.

LIN, L.; ZHU, Q.; ZHENG, L.; ZHAO, M.; FAN, J.; LIU, S. Preparation of sea cucumber (*Stichopus variegates*) peptide fraction with desired organoleptic property and its anti-aging activity in fruit flies and D-galactose-induced aging mice. **Journal of Functional Foods**, v. 69, p. 103954, 2020.

LIN, S.; HU, X.; LI, L.; YANG, X.; CHEN, S.; WU, Y.; YANG, S. Preparation, purification and identification of iron-chelating peptides derived from tilapia (*Oreochromis niloticus*) skin collagen and characterization of the peptide-iron complexes. **LWT**, v. 149, article. 111796, 2021.

- LIN, X.; CHEN, Y.; JIN, H.; ZHAO, Q.; LIU, C.; LI, R.; YU, F.; CHEN, Y.; HUANG, F.; YANG, Z.; DING, G.; TANG, Y. Collagen Extracted from Bigeye Tuna (*Thunnus obesus*) Skin by Isoelectric Precipitation: Physicochemical Properties, Proliferation, and Migration Activities. **Marine Drugs**, v. 17, n. 5, p. 261, 2019.
- LIPOETO, N.; GEOK LIN, K.; ANGELES-AGDEPPA, I. Food consumption patterns and nutrition transition in South-East Asia. **Public Health Nutrition**, v. 16, n. 9, p. 1637-1643, 2012.
- LIU, H.; HUANG, L.; WANG, J. Effects of loach skin collagen peptides in reducing osteoporosis in mice. **Journal of Functional Foods**, v. 75, p. 104228, 2020.
- LUO, J.; ZHOU, Z.; YAO, X.; FU, Y. Mineral-chelating peptides derived from fish collagen: preparation, bioactivity and bioavailability. **LWT**, v. 134, Artigo. 110209, 2020.
- LUONG, H.; THANH, T.; TRAN, T. Antimicrobial peptides – Advances in development of therapeutic applications. **Life Sciences**, v. 260, p. 118407, 2020.
- MASUDA, H.; AUNG, M. S.; KOBAYASHI, T.; NISHIZAWA, N. K. Iron Biofortification: The Gateway to Overcoming Hidden Hunger. **The Future of Rice Demand: Quality Beyond Productivity**, p. 149-177, 2020.
- MONTERO, P.; MOSQUERA, M.; MARÍN-PEÑALVER, D.; ALEMÁN, A.; MARTÍNEZ-ÁLVAREZ Ó.; GÓMEZ-GUILLÉN, M. C. Changes in structural integrity of sodium caseinate films by the addition of nanoliposomes encapsulating an active shrimp peptide fraction. **Journal of Food Engineering**, v. 244, p. 47-54, 2019.
- MÖRSCHBÄCHER, A.; GRANADA, C. Mapping the worldwide knowledge of antimicrobial substances produced by *Lactobacillus* spp.: A bibliometric analysis. **Biochemical Engineering Journal**, v. 180, p. 108343, 2022.
- MOSQUERA, M.; GIMÉNEZ, B.; RAMOS, S.; LÓPEZ-CABALLERO, M. E.; GÓMEZ-GUILLÉN, M. D. C.; MONTERO, P. Antioxidant, ACE-Inhibitory, and Antimicrobial Activities of Peptide Fractions Obtained from Dried Giant Squid Tunics. **Journal of Aquatic Food Product Technology**, v. 25, n. 3, p. 444-455, 2014.
- MURDAYANTI, Y.; KHAN, M. The development of internet financial reporting publications: A concise of bibliometric analysis. **Heliyon**, v. 7, n. 12, p. e08551, 2021.
- NAKCHUM, L.; KIM, S. Preparation of squid skin collagen hydrolysate as an antihyaluronidase, antityrosinase, and antioxidant agent. **Preparative Biochemistry & Biotechnology**, v. 46, n. 2, p. 123-130, 2016.
- NIRMALA, C. ET AL. BAMBOO: A RICH SOURCE OF NATURAL ANTIOXIDANTS AND ITS APPLICATIONS IN THE FOOD AND PHARMACEUTICAL INDUSTRY. **TRENDS IN FOOD SCIENCE & TECHNOLOGY**, V. 77, P. 91-99, 2018.
- NUÑEZ, S. M.; GUZMÁN, F.; VALENCIA, P.; ALMONACID, S.; CÁRDENAS, C. Collagen as a source of bioactive peptides: A bioinformatics approach. **Electronic Journal of Biotechnology**, v. 48, p. 101-108, 2020.
- OLATUNJI, O. Aquatic biopolymers. Cham: Springer, 2020.
- OLIVEIRA, V. D. M.; ASSIS, C. R. D.; COSTA, B. D. A. M.; NERI, R. C. D. A.; MONTE, F. T. D.; FREITAS, H. M. S. D. C. V.; FRANÇA, R. C. P.; SANTOS, J. F.; BEZERRA, R. D. S.; PORTO, A. L. F. Physical, biochemical, densitometric and spectroscopic techniques for characterization collagen from alternative sources: A review based on

the sustainable valorization of aquatic by-products. **Journal of Molecular Structure**, v. 1224, Article. 129023, 2021.

PAN, X.; ZHAO, Y.; HU, F.; WANG, B. Preparation and identification of antioxidant peptides from protein hydrolysate of skate (*Raja porosa*) cartilage. **Journal of Functional Foods**, v. 25, p. 220-230, 2016.

PARK, S.; JO, Y. Static hydrothermal processing and fractionation for production of a collagen peptide with anti-oxidative and anti-aging properties. **Process Biochemistry**, v. 83, p. 176-182, 2019.

PFALZGRAFF, A.; BRANDENBURG, K.; WEINDL, G. Antimicrobial Peptides and Their Therapeutic Potential for Bacterial Skin Infections and Wounds. **Frontiers in Pharmacology**, v. 9, 2018.

REYGAERT, W. An overview of the antimicrobial resistance mechanisms of bacteria. **AIMS Microbiology**, v. 4, n. 3, p. 482-501, 2018.

SALVATORE, L.; GALLO, N.; NATALI, M. L.; CAMPA, L.; LUNETTI, P.; MADAGHIELE, M.; BLASI, F. S.; CORALLO, A.; CAPOBIANCO, L.; SANNINO, A. Marine collagen and its derivatives: Versatile and sustainable bio-resources for healthcare. **Materials Science and Engineering**, v. 113, Artigo. 110963, 2020.

SHANG, Y.; YAO, S.; QIAO, X.; WANG, Z.; ZHAO, X.; HUANG, Z.; GU, Q.; WANG, N.; PENG, C. Evaluations of Marine Collagen Peptides from tilapia skin on experimental oral ulcer model of mice. **Materials Today Communications**, Artigo. 101893, 2020.

SIERRA, L. et al. Antioxidant peptides derived from hydrolysates of red tilapia (*Oreochromis sp.*) scale. **LWT**, v. 146, p. 111631, 2021.

SIERRA-LOPERA, L.; ZAPATA-MONTOYA, J. Optimization of enzymatic hydrolysis of Red Tilapia scales (*Oreochromis sp.*) to obtain bioactive peptides. **Biotechnology Reports**, p. e00611, 2021.

SONBOLI, R.; NAJAFI, Z.; ZAREZADEH, N.; YAZDANI, M.; BEHROUZ, H. Improving SDS-PAGE method for monoclonal antibodies: The advantages of Tris-Acetate over Tris-Glycine SDS-PAGE system and comparison with CE-SDS method. **Protein Expression and Purification**, v. 182, article. 105845, 2021.

SONG, Y.; FU, Y.; HUANG, S.; LIAO, L.; WU, Q.; WANG, Y.; GE, F.; FANG, B. Identification and antioxidant activity of bovine bone collagen-derived novel peptides prepared by recombinant collagenase from *Bacillus cereus*. **Food Chemistry**, v. 349, Artigo. 129143, 2021.

SOUZA, G. et al. Antimicrobial-wound healing peptides: dual-function molecules for the treatment of skin injuries. **Peptides**, p. 170707, 2021.

TANG, W.; ZHANG, H.; WANG, L.; QIAN, H.; QI, X. Targeted separation of antibacterial peptide from protein hydrolysate of anchovy cooking wastewater by equilibrium dialysis. **Food Chemistry**, v. 168, p. 115-123, 2015.

THUANHONG, M.; DE GOBBA, C.; SIRINUPONG, N.; YOURAVONG, W.; OTTE, J. Purification and characterization of angiotensin-converting enzyme-inhibitory peptides from Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) skin gelatine produced by an enzymatic membrane reactor. **Journal of Functional Foods**, v. 36, p. 243-254, 2017.

- WANG, C.; HONG, T.; CUI, P.; WANG, J.; XIA, J. Antimicrobial peptides towards clinical application: Delivery and formulation. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 175, p. 113818, 2021.
- WANG, L.; JIANG, Y.; WANG, X.; ZHOU, J.; CUI, H.; XU, W.; HE, Y.; 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.
- WIMLEY, W. Describing the Mechanism of Antimicrobial Peptide Action with the Interfacial Activity Model. **ACS Chemical Biology**, v. 5, n. 10, p. 905-917, 2010.
- WEI, X. et al. Effect of organosolv extraction on the structure and antioxidant activity of eucalyptus kraft lignin. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 187, p. 462-470, 2021.
- WOO, M.; SONG, Y.; KANG, K.; NOH, J. Anti-Obesity Effects of Collagen Peptide Derived from Skate (*Raja kenosjei*) Skin Through Regulation of Lipid Metabolism. **Marine Drugs**, v. 16, n. 9, p. 306, 2018.
- WU, R.; WU, C.; LIU, D.; YANG, X.; HUANG, J.; ZHANG, J.; LIAO, B.; HE, H. Antioxidant and anti-freezing peptides from salmon collagen hydrolysate prepared by bacterial extracellular protease. **Food Chemistry**, v. 248, p. 346-352, 2018.
- WU, W.; LI, B.; HOU, H.; ZHANG, H.; ZHAO, X. Identification of iron-chelating peptides from Pacific cod skin gelatin and the possible binding mode. **Journal of Functional Foods**, v. 35, p. 418-427, 2017.
- WU, W.; YANG, Y.; SUN, N.; BAO, Z.; LIN, S. Food protein-derived iron-chelating peptides: The binding mode and promotive effects of iron bioavailability. **Food Research International**, v. 131, article. 108976, 2020.
- YANG, T.; ZHANG, K.; LI, B.; HOU, H. Effects of oral administration of peptides with low molecular weight from Alaska Pollock (*Theragra chalcogramma*) on cutaneous wound healing. **Journal of Functional Foods**, v. 48, p. 682-691, 2018.
- ZHANG, Y.; DING, X.; LI, M. Preparation, characterization and in vitro stability of iron-chelating peptides from mung beans. **Food Chemistry**, v. 349, p. 129101, 2021.
- ZHAO, X.; ZHANG, X.; LIU, D. Collagen peptides and the related synthetic peptides: A review on improving skin health. **Journal of Functional Foods**, v. 86, p. 104680, 2021.
- ZENG, S.; WU, W.; ZHANG, C.; YIN, J.; LI, Z. Antioxidant activity of collagen hydrolysate obtained from tilapia scales in vitro and in vivo assays. Proceedings of the 3rd International Conference on Material, **Mechanical and Manufacturing Engineering**, 2015.
- ZOU, Y.; WANG, L.; CAI, P.; LI, P.; ZHANG, M.; SUN, Z.; SUN, C.; XU, W.; WANG, D. Effect of ultrasound assisted extraction on the physicochemical and functional properties of collagen from soft-shelled turtle calipash. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 105, p. 1602-1610, 2017.
- ZHU, L.; XIE, Y.; WEN, B.; YE, M.; LIU, Y.; IMAM, K. M. S. U.; CAI, H.; ZHANG, C.; WANG, F.; XIN, F. Porcine bone collagen peptides promote osteoblast proliferation and differentiation by activating the PI3K/Akt signaling pathway. **Journal of Functional Foods**, v. 64, Article. 103697, 2020.

CAPÍTULO II:

EXTRAÇÃO DE PROTEASES COLAGENOLÍTICAS DE *Aspergillus heteromorphus* URM 0269 EM SISTEMA DE DUAS FASES AQUOSAS PARA APLICAÇÃO NA HIDRÓLISE DE COLÁGENO

Beatriz de Aquino Marques da Costa¹, Lígia Maria Fernandes Gonçalves¹, Ana Lúcia Figueiredo Porto¹, Vagne de Melo Oliveira¹ e Tatiana Souza Porto¹

¹Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal, Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE), Rua Manuel de Medeiros, s/n - Dois Irmãos, Recife, Pernambuco, 52171-900, Brasil.

RESUMO

Proteases com atividade colagenolítica produzidas por *Aspergillus heteromorphus* foram extraídas utilizando sistema de duas fases aquosas (SDFA) PEG/sulfato. O extrato bruto proveniente da fermentação foi submetido a um planejamento fatorial 2^3 para análise das variáveis independentes: massa molar de PEG (M_{PEG}), concentração de PEG (C_{PEG}) e concentração de sulfato (C_{sulf}). As proteases extraídas por SDFA PEG/sulfato também foram avaliadas quanto ao seu pH ótimo e sua estabilidade em diferentes níveis de pH (4,0 – 11,0) após incubação por 20 horas. A extração de colágeno a partir de resíduos de pele de cioba (*Lutjanus analis*) foi realizada utilizando ácido acético (0,5M). A enzima foi particionada preferencialmente para a fase rica em PEG ($K>1$) cujo maior fator de purificação e recuperação ($FP = 6,256$ e $Y = 404,432\%$) foi obtido sob as condições $M_{PEG} 8000$ g/mol, $C_{PEG} 30\%$, $C_{sulf} 10\%$. A avaliação do efeito do pH sobre a atividade enzimática revelou que a extração em SDFA proporcionou uma faixa de pH com alta atividade enzimática (7,0 – 11,0). Além disso, as amostras enzimáticas de SDFA apresentaram-se mais estáveis em relação ao extrato bruto, mantendo pelo menos 80% de sua atividade proteásica após 20 horas de incubação para todos os níveis de pH analisados, exceto o pH 11,0. Foi obtido um rendimento de 8,056% a partir da extração do colágeno de pele de cioba (*L. analis*) e o ensaio de hidrólise utilizando as amostras enzimáticas de extrato bruto e aquelas da fase PEG do SDFA se mostraram capazes de hidrolisar o colágeno extraído, ambas obtendo um pico de hidrólise após 36h de tratamento. Os resultados obtidos no presente trabalho, demonstraram que foi possível extrair proteases com alto índice de purificação e recuperação, bem como alta ação da enzima hidrolisando o colágeno de cioba (*L. analis*), mas espera-se ainda elucidar as propriedades e potencial biológico dos hidrolisados produzidos.

ABSTRACT

Proteases with collagenolytic activity produced by *Aspergillus heteromorphus* were extracted using a two-phase PEG/sulfate aqueous system (ATPS). The crude extract from the fermentation was submitted to a 2^3 factorial design to analyze the independent variables: PEG molar mass (M_{PEG}), PEG concentration (C_{PEG}) and sulfate concentration (C_{sulf}). The proteases extracted by PEG/sulfate SDFAs were also evaluated for their optimal pH and their stability at different pH levels (4.0 – 11.0) after incubation for 20 hours. Collagen extraction from red snapper (*Lutjanus analis*) skin residues was performed using acetic acid (0.5M). The enzyme was partitioned preferentially to the PEG-rich phase ($K > 1$) whose highest purification and recovery factor (PF = 6.256 and Y = 404.432%) was obtained under the conditions M_{PEG} 8000 g/mol, C_{PEG} 30%, C_{sulf} 10%. The evaluation of the effect of pH on the enzymatic activity revealed that the extraction in ATPS provided a pH range with high enzymatic activity (7.0 – 11.0). Furthermore, the enzymatic samples of ATPS were more stable in relation to the crude extract, maintaining at least 80% of their protease activity after 20 hours of incubation for all pH levels analyzed, except for pH 11.0. A yield of 8.056% was obtained from the extraction of collagen from red snapper (*L. analis*) skin and the hydrolysis assay using enzymatic samples of the crude extract and those of the PEG phase of ATPS proved capable of hydrolyzing the extracted collagen, both obtaining a hydrolysis peak after 36h of treatment. The results obtained in the present work demonstrated that it was possible to extract proteases with excellent purification and recovery, as well as the action of the enzyme hydrolyzing red snapper (*L. analis*) collagen, but it is still expected to elucidate the properties and biological potential of the hydrolysates produced.

1 - INTRODUÇÃO

Proteases com atividade colagenolítica têm ação específica, e são capazes de hidrolisar a estrutura fibrosa característica das moléculas colagenosas e produzir fragmentos menores, os peptídeos de colágeno. Essas enzimas são altamente valiosas para variados ramos da indústria, como no processamento do couro e de pescado, indústria de processamento de alimentos e bebidas, indústria farmacêutica e cosmética, na produção de hidrolisados proteicos, além da pesquisa científica (BIŠKAUSKAITĖ et al., 2021; SILVA et al., 2018; DABOOR et al., 2012).

Micro-organismos são notáveis produtores de proteases, e são os principais organismos utilizados na indústria. Apesar de plantas e animais também serem potenciais fontes dessas enzimas, os micro-organismos apresentam atributos vantajosos, como a independência de fatores ambientais e de uma grande quantidade de espaço para o seu desenvolvimento, alta variabilidade genética e fácil manipulação. Além disso, fungos filamentosos como os do gênero *Aspergillus* sintetizam suas enzimas no meio extracelular. Essa característica é uma vantagem da sua utilização na indústria em relação a bactérias, pois a posterior recuperação das proteases produzidas é facilitada (WANDERLEY et al., 2017).

Proteases são tradicionalmente purificadas por meio de técnicas como precipitação, ultrafiltração e cromatografia. No entanto, a necessidade de equipamentos caros, o uso de solventes tóxicos e o consumo de tempo e energia dessas técnicas aumenta os custos de sua aplicação e inibe seu uso em larga escala (LIMA et al., 2013). Diante desses desafios, o sistema de duas fases aquosas (S DFA) é proposto como um método alternativo de separação, concentração e purificação de material genético, células, organelas, proteínas e proteases, por conta de fatores como seu menor tempo de processamento, utilização de componentes de baixo custo, baixa complexidade técnica e possibilidade de reutilização do material usado, características que se refletem em benefícios operacionais, econômicos e ambientais do seu uso (IQBAL et al., 2016).

Os SDFAs geralmente são compostos pela mistura de dois polímeros hidrofílicos ou um polímero (geralmente polietilenoglicol (PEG)) e um sal (citrato, fosfato, sulfato), separados de forma espontânea em um meio aquoso (SILVA et al., 2017). Ao contrário de metodologias danosas a biomoléculas sensíveis, os polímeros

utilizados em SDFAs tendem a estabilizar a estrutura proteica e aumentar sua atividade biológica. Além disso, o equilíbrio no teor de água (até 90%) entre as duas fases mantém o sistema estável até o fim da purificação, prevenindo a perda de atividade (VARADAVENKATESAN et al., 2021). Nesse contexto, o presente trabalho teve como objetivo extrair proteases com atividade colagenolítica de *Aspergillus heteromorphus* URM0269 em sistema de duas fases aquosas PEG/sulfato, assim como avaliar seu potencial na hidrólise de colágeno.

2 - MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 - *Micro-organismo*

Foi utilizado o fungo filamentosso *Aspergillus heteromorphus* URM 0269 proveniente da micoteca URM da Universidade Federal de Pernambuco, afiliada a Federação Mundial de Coleções de Culturas (WFCC - Nº 604). O fungo foi mantido em meio BDA (Batata Dextrose Agar) a 30°C por 7 dias até a esporulação. Os esporos foram então coletados com a adição de 5mL de NaCl a 0,9% e solução Tween 80 a 0,01% previamente esterilizada a 121°C por 20 minutos.

2.2 *Condições de fermentação*

A fermentação em estado sólido foi realizada em frascos Erlenmeyer de 125 mL contendo 3g de farelo de trigo a 30°C por 96 horas. O substrato foi levado a uma umidade de 20% pela inoculação de 10⁶ esporos/mL e solução nutritiva. O extrato enzimático foi então coletado a partir da adição de 7,5 mL de solução fosfato de sódio 0,1M (pH 7,0) por grama de material fermentado e homogeneizado em mesa agitadora por 1 hora. Então, as partes sólidas foram removidas e foi realizada a centrifugação e filtração a vácuo. O extrato enzimático obtido foi utilizado na extração por SDFAs.

2.3 *Concentração de Proteínas e Atividade Proteásica Total*

A concentração total de proteínas foi determinada de acordo com o método descrito por Bradford (1976) utilizando Azul de Coomassie G250 como corante e albumina sérica bovina como padrão. Para a mistura reacional utilizou-se 50 µL da amostra enzimática (SDFAs ou extrato bruto) e 1,5 mL da solução de Bradford e sua densidade óptica foi mensurada em espectrofotômetro a 595nm.

A atividade proteásica foi mensurada de acordo com o método descrito por Leighton et al. (1973), com modificações. O volume de 0,15 mL do extrato enzimático foi misturado a 0,25 mL de solução de azocaseína (1% de azocaseína dissolvida em tampão Tris-HCl 0,1M, pH 7,4) por 60 minutos a 25°C. A reação foi interrompida pela adição de 1,2 mL solução a 10% de ácido tricloroacético. As amostras foram centrifugadas a 8000 rpm (Z326K – HERMLE Labortechnik GmbH) por 15 minutos a 4°C. Então, 0,8 mL do sobrenadante foi adicionado a 1,4 mL de NaOH 1,0M. Uma unidade de atividade proteásica foi definida como a quantidade de enzima necessária para propiciar um aumento de 0,1 na absorbância a 420nm em 1 hora.

2.4 Atividade da Protease Colagenolítica

A atividade da protease colagenolítica foi mensurada de acordo com o método descrito por Chavira (1984). o azocoll (colágeno impregnado em corante Azo) foi lavado e suspenso em tampão Tris-HCl 0,2M (pH 7,6) até uma concentração final de 5 mg/mL. Então, foram adicionados 50 µL do extrato enzimático e 950 µL da suspensão de azocoll e estes foram incubados a 37°C por 3 horas, sendo agitados a cada 30 minutos. Após o tempo de incubação e arrefecimento, as amostras foram centrifugadas a 8000 rpm por 10 minutos e sua absorbância foi mensurada em espectrofotômetro. Uma unidade de atividade enzimática foi definida como a quantidade de enzima capaz de levar a 0,1 de aumento na absorbância a 520nm após 3 horas de incubação. A atividade específica foi calculada como a razão entre a atividade enzimática e o conteúdo de proteínas total da amostra e expressado em U/mg.

2.5 Sistema de Duas Fases Aquosas

O sistema de suas fases aquosas foi realizado de acordo com um planejamento fatorial 2³. O sal utilizado foi o sulfato de sódio (Na₂SO₄) e o polímero foi o polietilenoglicol (PEG). A solução a 30% (m/m) de sulfato de sódio foi adicionada em diferentes quantidades em tubos cônicos graduados de 15 mL contendo o PEG em massas molares variadas, de acordo com o planejamento, sendo 3 repetições do ponto central, a fim de estimar o erro experimental (Tabela 1). Após a adição de água e do extrato enzimático (20% da massa total), as suspensões foram homogeneizadas em vórtex por 1 minuto e deixadas em repouso para decantação por 1 hora para a

separação das fases. A influência das variáveis investigadas foram: massa molar do PEG (M_{PEG}), concentração do PEG (C_{PEG}) e concentração do sulfato (C_{SULF}). A interferência do polímero e do sal foi mensurada a partir da preparação de amostras “branco”, contendo as mesmas concentrações dos componentes, porém, com adição de 20% de água destilada no lugar do extrato enzimático. A análise estatística foi realizada utilizando o software *Statistica 8.0* (Stasoft Inc.)

Tabela 1. Níveis do planejamento experimental 2^3 para a extração de proteases com atividade colagenolíticas utilizando SDFA PEG/Sulfato.

Variáveis	Níveis		
	-1	0	+1
M_{PEG} (g/mol)	4000	6000	8000
C_{PEG} (% m/m)	18	24	30
C_{Sulf} (% m/m)	10	11,5	13

M_{PEG} = Massa molar do PEG; C_{PEG} = Concentração do PEG; C_{Sulf} = Concentração do sulfato)

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

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

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

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

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

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

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

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

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

2.7 Efeito do pH sobre a atividade e estabilidade das proteases e protease com atividade colagenolítica

A atividade proteásica foi determinada a partir da incubação das amostras enzimáticas em soluções de azocaseína preparadas com diferentes tampões a 0,2 M, estabelecendo uma variação de pH (4,0 - 11). A determinação da atividade colagenolítica foi realizada a partir da incubação das amostras enzimáticas em solução de azocoll com a mesma variação de pH. Os procedimentos realizados na determinação das atividades proteásica e colagenolítica foi o mesmo descrito nos Itens 2.3 e 2.4, respectivamente. Essas atividades foram então expressas como a atividade relativa em percentual comparada ao valor máximo e os resultados foram expressos como médias e desvios padrão.

A estabilidade das proteases foi determinada a partir da incubação das amostras enzimáticas nas soluções de azocaseína e azocoll supracitados, avaliando a atividade proteásica em diferentes tempos (0, 4, 8, 12, 16, 20 horas) e a expressando como a porcentagem de atividade residual em comparação com o valor inicial (tempo zero).

2.8 Extração do colágeno e ensaio de capacidade hidrolítica

2.8.1 Pré- tratamento dos resíduos de pele

O colágeno foi extraído a partir da pele de cioba (*Lutjanus analis*) proveniente de uma associação de pescadores no Janga, Paulista, Pernambuco, Brasil. O procedimento de pré-tratamento dos resíduos de pele foi realizado de acordo como método descrito por Oliveira et al. (2019). Para a remoção de proteínas não

colagenosas, os resíduos de pele foram inicialmente misturados a uma solução de NaOH (0,2M) a uma proporção de 1:10 (p/v) e agitadas continuamente por 3 horas. Após agitação e lavagem com água destilada, a pele tratada foi adicionada a uma solução de 10% de álcool butílico na proporção de 1:10 (p/v) e mantida sob agitação durante 6 horas para remoção de gorduras. A etapa final do pré-tratamento (branqueamento) foi realizada utilizando uma solução de 3% de peróxido de hidrogênio, onde os resíduos de pele foram mantidos sob agitação por 1 hora. Todos os procedimentos do pré-tratamento foram realizados sob refrigeração a 4°C.

2.8.2 Extração do colágeno

O isolamento do colágeno solúvel em ácido (ASC) foi realizada segundo Hukmi; Sarbon (2018). Os resíduos obtidos após o pré-tratamento misturados a uma solução de ácido acético (0,5M) na proporção de 1:10 (p/v) e mantidos sob agitação contínua por 24 horas (4°C). Em seguida, o material foi centrifugado a 10.000 rpm por 30 minutos. Os sobrenadantes resultantes foram separados e submetidos a uma re-extração com ácido acético 0,5 M por 12 horas e nova centrifugação. A precipitação do colágeno extraído foi realizada utilizando tampão de carbonato-bicarbonato, seguida de centrifugação, diálise (24 horas) e liofilização do material extraído.

2.8.3 Ensaio de capacidade hidrolítica

A digestão do colágeno extraído da pele de cioba (*Lutjanus analis*) foi realizado de acordo com o método de Moore & Stein (1954) e Park et al., (2002) com modificações. Uma mistura contendo 5 mg de colágeno, 1 mL de Tris-HCl 50 mM (pH 7,5 com 0,36 mM CaCl₂) e 0,1 mL da amostra enzimática (extrato bruto ou SDFa), foi incubada a 37°C por 12, 24, 36, 48, 60 e 72 horas. A reação foi interrompida pela adição de 0,2 mL de ácido tricloroacético a 50%. Após 10 minutos em temperatura ambiente, a solução foi centrifugada a 8000 rpm por 20 minutos. Em seguida, 0,2 mL do sobrenadante foi misturado com 1 mL de uma solução de ninhidrina (4%), incubada a 100°C por 20 minutos. Posteriormente, cada amostra foi diluída em 5 mL de 1-propanol 50% e sua absorbância foi mensurada a 570 nm. A curva padrão foi determinada utilizando leucina nas concentrações 0, 1,0, 1,5, 2,0, 2,5, 3,0, 3,5, e 4,0 mM.

3 - RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Extração de proteases utilizando SDFA PEG/sulfato.

Os resultados do planejamento experimental para a influência de variáveis independentes, massa molar de PEG (M_{PEG}), concentração de PEG (C_{PEG}), e concentração de sal de sulfato (C_{sulf}) na extração de proteases utilizando SDFA PEG/sulfato são apresentados na Tabela 2.

Tabela 2. Extração de proteases de *Aspergillus heteromorphus* URM 0269 utilizando planejamento fatorial 2^3 .

Ensaio	M_{PEG} (g/mol)	C_{PEG} (%)	C_{sulf} (%)	K_P	$Y_{P\ top}$ (%)	$FP_{P\ top}$
1	4000	18	10	0,932	80,021	1,751
2	8000	18	10	1	82,395	2,008
3	4000	30	10	3,761	180,620	2,513
4	8000	30	10	11,178	148,236	2,293
5	4000	18	13	1,906	129,292	2,217
6	8000	18	13	1,888	128,470	2,191
7	4000	30	13	24,166	173,652	2,690
8	8000	30	13	22,297	156,886	3,316
9	6000	24	11.5	2,145	129,210	2,242
10	6000	24	11.5	2,442	139,139	2,150
11	6000	24	11.5	2,534	140,054	2,509
12	6000	24	11.5	3,066	145,019	2,287

M_{PEG} = Massa molar do PEG; C_{PEG} = Concentração do PEG; C_{sulf} = Concentração do sulfato; K_P = Coeficiente de partição da protease; $Y_{P\ top}$ = Recuperação da protease na fase superior; $FP_{P\ top}$ = Fator de purificação da protease na fase superior.

Observando os valores de K_P obtidos (Tabela 2), é possível inferir que as proteases tenderam a particionar para a fase superior, rica em PEG (exceto o ensaio 1), visto que os valores de $K \geq 1$ obtidos para a essa variável sugerem que a atividade da fase PEG é superior a da fase rica em sal. As condições mais favoráveis para o particionamento de proteases foram a presença de PEG e sulfato em suas maiores concentrações (30% e 13%, respectivamente), como é o caso do ensaio 7 ($K_P = 24,166$).

A Tabela 3 apresenta as respostas coeficiente de partição (K_P), recuperação da atividade proteásica (Y_P) e fator de purificação (FP_P) obtidos em relação as variáveis massa molar do PEG (M_{PEG}), concentração do PEG (C_{PEG}) e concentração do sulfato (C_{sulf}), assim como suas interações, na extração de proteases de *A. heteromorphus*.

Tabela 3. Efeitos e interações das variáveis do SDFA na extração de proteases de *Aspergillus heteromorphus* URM 0269 utilizando planejamento fatorial 2^3 .

Variáveis e interações	Respostas		
	K_P	$Y_{P\ top}$	$FP_{P\ top}$
(1) M_{PEG}	5,155*	-2,541	1,479
(2) C_{PEG}	51,282*	12,772*	6,416*
(3) C_{sulf}	30,749*	5,180*	4,297*
1*2	5,063*	-2,707	0,406
1*3	-8,631*	0,663	1,310
2*3	27,319*	-5,001*	1,281
1*2*3	-8,473*	1,004	2,624

M_{PEG} = Massa molar do PEG; C_{PEG} = Concentração do PEG; C_{sulf} = Concentração do sulfato; K_P = Coeficiente de partição da protease; $Y_{P\ top}$ = Recuperação na fase superior; $FP_{P\ top}$ = Fator de purificação na fase superior. *Estatisticamente significativo $p < 0,05$.

A análise revelou os principais efeitos e a existência de interação entre eles. Ao analisar os efeitos das variáveis e suas interações sobre o coeficiente de partição, pode-se notar que todos os efeitos principais assim como suas interações foram significativos para os valores de K_P , ou seja, o efeito de qualquer uma das variáveis depende fortemente dos níveis dos demais fatores.

A migração das proteases dentro de um sistema pode ser explicada por dois fenômenos principais, o efeito *salting out* e o efeito de volume excluído. O *salting out* explica a diminuição da solubilidade das biomoléculas na fase inferior pela alta concentração de sal, o que leva à formação do sistema bifásico. O efeito do volume excluído define que o volume ocupado pelas moléculas do polímero presentes na fase superior do sistema aumenta com sua concentração e massa molar, pressionando as biomoléculas a migrarem para a fase rica em sal (FERNANDES et al., 2020; IQBAL et al., 2016).

A C_{PEG} teve a mais alta influência positiva sobre o coeficiente de partição das proteases de *Aspergillus heteromorphus* URM 0269, o que denota que o aumento de sua concentração levaria a migração enzimática para a fase rica em sal, de acordo

com o efeito de volume excluído, ao contrário da tendência observada. Considerando as condições do ensaio com maior K_P (ensaio 7), o fenômeno da migração das proteases para a fase superior pode ser explicado pela baixa massa molar do PEG e a alta concentração de sal presente no sistema (30%). Sob essas condições, o efeito *salting out* se sobressai em relação ao volume excluído, a partir da neutralização das cargas elétricas promovida pelo sal e consequente alteração da solubilidade dessas enzimas, aumentando sua afinidade com o PEG. A Figura 1 apresenta a relação entre as variáveis C_{PEG} e C_{sulf} em relação ao K_P , pois a interação entre as duas variáveis (2×3) foi significativa e positiva (como apresentado na Tabela 3), indicando que o aumento sinérgico de ambas favoreceu a partição da protease para a fase rica em PEG.

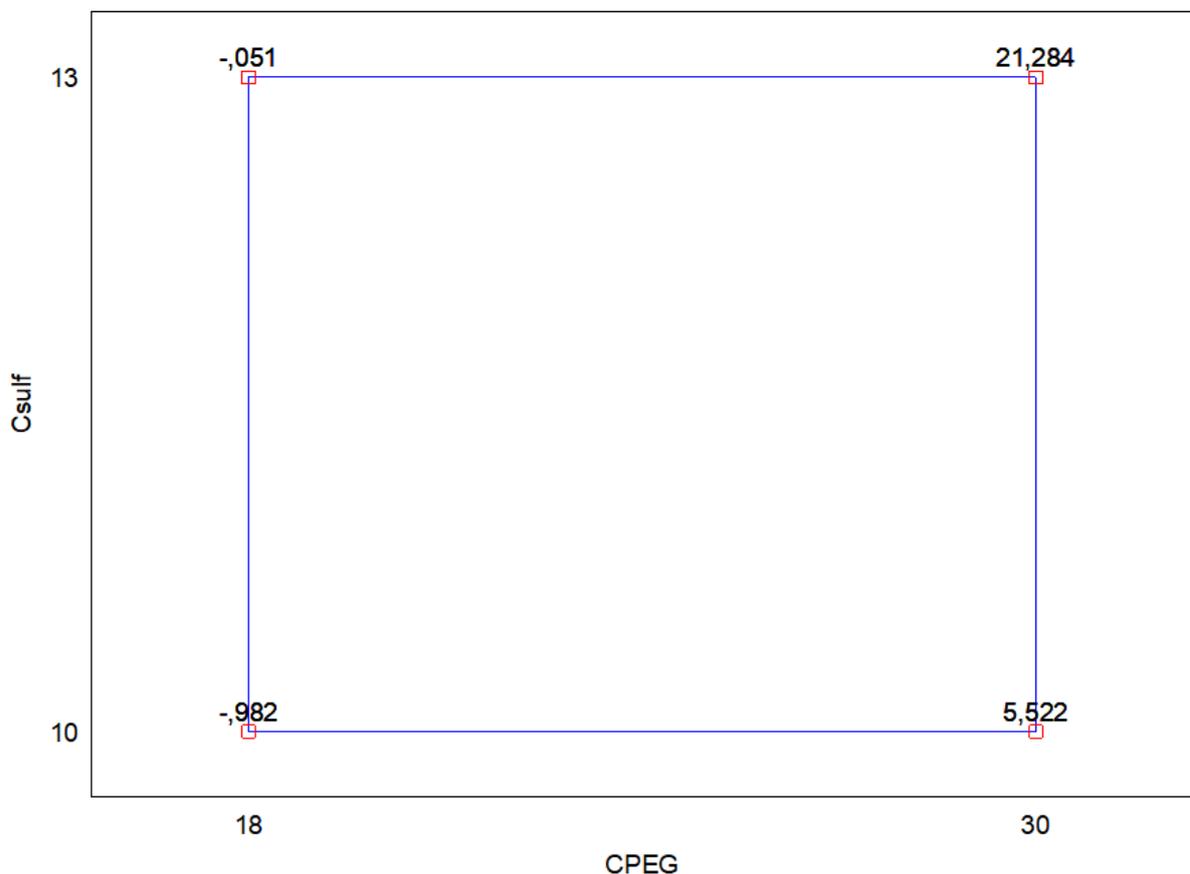


Figura 1. Gráfico de interpretação geométrica da interação significativa entre as variáveis C_{PEG} e C_{sulf} sobre o coeficiente de partição de proteases (K_P).

Na Tabela 2 é possível observar os valores de recuperação de atividade proteásica (Y_P) após a extração utilizando SDFA. O conjunto de resultados apresentados é promissor, pois todos os ensaios realizados de acordo com o planejamento fatorial 2^3 , exceto os ensaios 1 e 2, obtiveram valores de recuperação

de atividade proteásica (Y_P) acima de 100%. Valores de recuperação superiores a 100%, podem estar associados à remoção de contaminantes e inibidores durante a partição, o que aumenta a atividade enzimática (NASCIMENTO et al., 2016).

O maior valor de Y_P obtido (ensaio 3) foi de 180,620%, cujas condições do ensaio eram M_{PEG} de 4000 g/mol, C_{PEG} de 30% e C_{sulf} de 10%. Maiores valores de Y são frequentemente associados com a utilização de uma maior concentração de PEG com menor massa molar (LIMA et al., 2013), como o resultado obtido no presente trabalho. Uma explicação para esse fenômeno é o aumento da viscosidade do solvente consequente do aumento da massa molar do PEG, que diminui a atividade enzimática, como observado para carboxipeptidase, tripsina, catalase e lactato desidrogenase (ARAÚJO et al., 2011). O valor de Y obtido no presente trabalho foi maior do que o apresentado por outros trabalhos com enzimas de origem fúngica, como Nascimento et al. (2016) (PEG/sulfato - 130%), Amaral et al. (2020) (PEG/citrato - 84%) e Siqueira et al. (2020) (PEG/fosfato - 113,15%).

Assim como para os valores de K_P , C_{PEG} e C_{sulf} foram as variáveis mais influentes sobre os valores de Y_P , no entanto, ao contrário do coeficiente de partição, a interação entre as duas variáveis mostrou-se negativa, ou seja, C_{PEG} e C_{sulf} têm efeitos antagônicos sobre a recuperação da atividade proteásica.

O maior fator de purificação (3,316) foi obtido sob as condições M_{PEG} de 8000, C_{PEG} de 30% e C_{sulf} de 13% (Ensaio 8). A C_{PEG} foi a variável de maior influência positiva sobre o fator de purificação na fase superior (PEG). O padrão observado para K e Y também pode ser identificado para o FP (Tabela 3), sendo C_{sulf} a segunda variável mais influente sobre a resposta (Figura 2), no entanto a interação entre as variáveis não se mostrou significativa. Outros autores obtiveram resultados similares de fator de purificação de proteases fúngicas. Hajji et al. (2007) e Yadav et al. (2015) obtiveram um valor de FP de 3,2 para proteases produzidas por *Aspergillus calvatus*. Salihi et al. (2017), por sua vez, reportaram um valor máximo de FP de 1,01 para proteases produzidas por *Aspergillus oryzae*.

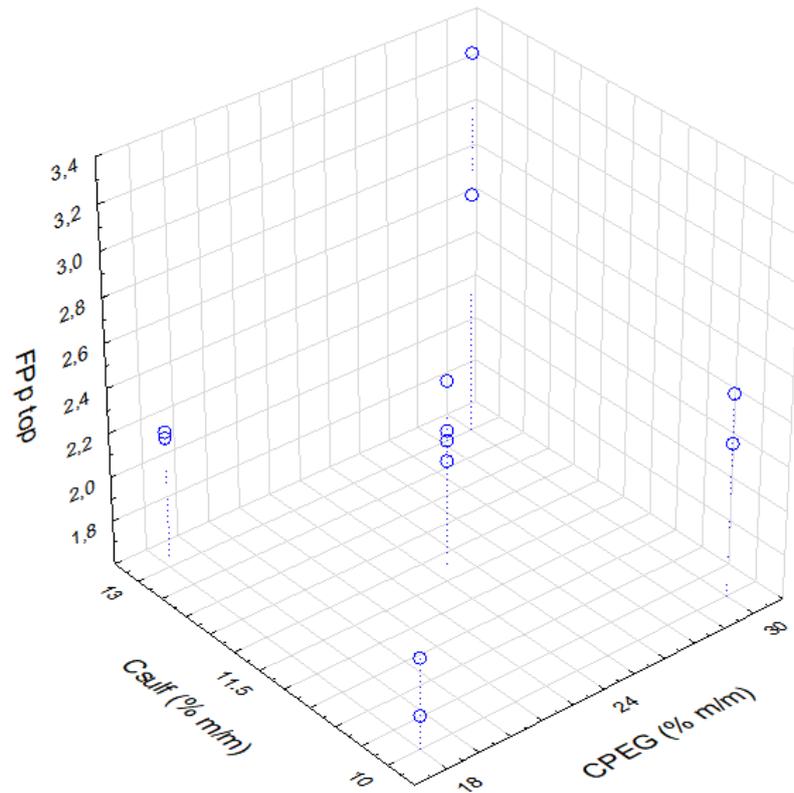


Figura 2. Efeitos simultâneos da concentração de sulfato (C_{sulf}) e massa molar de PEG (M_{PEG}) sobre o fator de purificação de proteases (FP_{top}) no SDFA PEG/sulfato.

3.2 Extração de proteases com atividade colagenolíticas utilizando SDFA PEG/sulfato

Os resultados do planejamento experimental para a influência de variáveis independentes, massa molar de PEG (M_{PEG}), concentração de PEG (C_{PEG}), e concentração de sal de sulfato (C_{sulf}) na extração de proteases colagenolíticas utilizando SDFA PEG/sulfato são apresentados na Tabela 4.

Tabela 4. Extração de proteases com atividade colagenolítica de *Aspergillus heteromorphus* URM 0269 utilizando planejamento fatorial 2³.

Ensaio	M _{PEG} (g/mol)	C _{PEG} (%)	C _{sulf} (%)	K _C	Y _{C top} (%)	FP _{C top}
1	4000	18	10	68,250	110,737	2,424
2	8000	18	10	23,308	133,008	3,242
3	4000	30	10	47,063	245,447	3,416
4	8000	30	10	50,039	404,432	6,256
5	4000	18	13	37,942	142,914	2,451
6	8000	18	13	35,222	174,945	2,984
7	4000	30	13	35,327	155,484	2,409
8	8000	30	13	19,267	169,599	3,585
9	6000	24	11.5	41,392	216,556	3,759
10	6000	24	11.5	87,611	208,874	3,229
11	6000	24	11.5	86,853	235,828	4,225
12	6000	24	11.5	68,697	195,629	3,086

M_{PEG} = Massa molar do PEG; C_{PEG} = Concentração do PEG; C_{sulf} = Concentração do sulfato; K_C = Coeficiente de partição da colagenase; Y_{C top} = Recuperação da colagenase na fase superior; FP_{C top} = Fator de purificação da colagenase na fase superior.

Ao analisar os valores obtidos para o coeficiente de partição de proteases colagenolíticas (Tabela 4), também pode-se observar a tendência de particionamento dessas enzimas para a fase superior, rica em PEG (valores de K > 1) em todos os ensaios. As condições mais favoráveis para o particionamento foram aquelas presentes nos ensaios do ponto central (M_{PEG} de 6000 g/mol, C_{PEG} de 24% e C_{sulf} de 11,5%), com valores de K de até 87, 611. Ao analisar os efeitos das variáveis e suas interações sobre o coeficiente de partição (K_C), nenhuma das variáveis ou suas interações foram significativas sobre o coeficiente de partição. As diferenças observadas nos padrões de coeficiente de partição e nas respostas discutidas a seguir em relação às proteases abordadas no item anterior apontam para a existência de enzimas com características distintas dentro do extrato analisado.

A Tabela 5 apresenta a influência das variáveis massa molar do PEG (M_{PEG}), concentração do PEG (C_{PEG}) e concentração do sulfato (C_{sulf}) assim como suas interações sobre as respostas coeficiente de partição (K_C), recuperação da atividade

colagenolítica (Y_C) e fator de purificação (FP_C), na extração de proteases colagenolíticas de *A. heteromorphus*.

Tabela 5. Efeitos e interações das variáveis da extração de proteases com atividade colagenolítica de *Aspergillus heteromorphus* URM 0269 em S DFA utilizando planejamento fatorial 2^3 .

Variáveis e interações	Respostas		
	K	Y_{top}	FP_{top}
(1) M_{PEG}	-0,990	4,786*	3,639*
(2) C_{PEG}	-0,212	8,669*	3,094
(3) C_{sulf}	-0,993	-5,276*	-2,649
1*2	0,564	-2,500	1,807
1*3	0,378	-2,843	-1,321
2*3	-0,393	-8,395*	-2,336
1*2*3	-0,999	-3,254*	-0,934

M_{PEG} = Massa molar do PEG; C_{PEG} = Concentração do PEG; C_{sulf} = Concentração do sulfato; K = Coeficiente de partição; Y_{top} = Recuperação na fase superior; FP_{top} = Fator de purificação na fase superior. *Estatisticamente significativo $p < 0,05$.

As porcentagens de recuperação da atividade colagenolíticas (Y_C) estão expressos na Tabela 4. Como pode-se observar todos os valores estão acima de 100%, o que demonstra que o planejamento fatorial 2^3 foi capaz de induzir um aumento da atividade colagenolítica (WANDERLEY et al., 2020), assim como observado na recuperação da atividade proteásica, discutida no item 3.1.

O maior valor de recuperação da atividade colagenolítica obtido (ensaio 4) foi de 404,432%, cujas condições do ensaio eram M_{PEG} de 8000 g/mol, C_{PEG} de 30% e C_{sulf} de 10%. A variável C_{PEG} e sua interação antagônica com C_{sulf} foram os fatores significativos e de maior influência sobre Y_C (Figura 3). Dos demais efeitos significativos, a M_{PEG} apresentou efeito positivo, indicando que a maior massa do PEG proporcionou os maiores valores de recuperação em atividade colagenolítica. Os valores de Y obtidos no presente trabalho foram maiores do que os apresentados por Wanderley et al. (2020) (244,47%), Wanderley et al. (2017) (82%) e Rosso et al. (2012) (242%), que utilizaram o S DFA para extração de proteases colagenolíticas de diferentes micro-organismos.

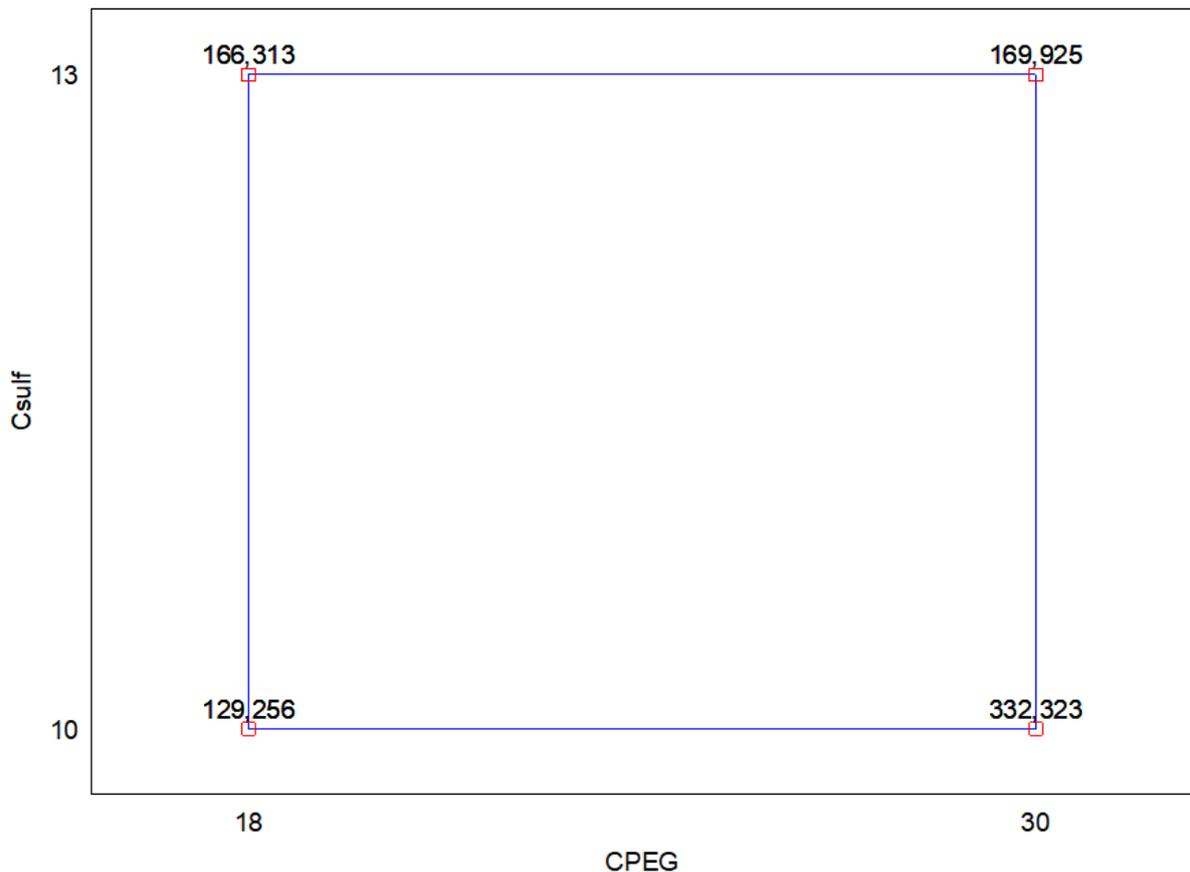


Figura 3. Gráfico de interpretação geométrica da interação significativa entre as variáveis C_{PEG} e C_{sulf} sobre a recuperação da atividade colagenolítica (Y_c).

As condições do ensaio 4 também propiciaram o maior fator de purificação (FP_C) entre os ensaios (6,256). A massa molar do PEG foi a única variável significativa sobre o fator de purificação em relação a protease colagenolítica. O efeito positivo de M_{PEG} sobre o fator de purificação significa que essa resposta aumenta com o aumento da massa molar do polímero. Esse efeito pode ser explicado pelo efeito de exclusão de volume descrito no Item 3.1 e pelo efeito de eliminação de contaminantes para a fase salina, concentrando a enzima de interesse na fase PEG. Nascimento et al. (2016), reportaram a migração de enzimas fibrinolíticas extraídas utilizando SDFA PEG/sulfato para a fase rica em sal ($K < 1$). Os autores mencionam que o maior FP foi encontrado nos pontos centrais da fase inferior (4,5). Na fase superior, o maior FP obtido (3,5) foi do ensaio de condições M_{PEG} 4000 g/mol, C_{PEG} 30% e C_{sulf} 13,2.

O efeito do aumento da massa molar do PEG sobre o valor de FP foi demonstrado por Porto et al. (2008) na extração de proteases utilizando SDFA PEG/citrato, onde, ao aumentar a massa molar do PEG de 1500 para 10.000, mantendo a concentração de citrato (12%) foi observado um aumento de 2,3 para 4,8

no fator de purificação. Mais recentemente, Fernandes et al. (2020) observou o mesmo padrão de influência da M_{PEG} sobre o fator de purificação de proteases produzidas por *A. heteromorphus* utilizando SDFA PEG/citrato, obtendo seu maior FP sob as condições M_{PEG} de 8000, C_{PEG} de 24% e C_{CIT} de 15%.

3.3 Efeito do pH sobre a atividade e estabilidade das proteases

As proteases extraídas no SDFA PEG/sulfato sob as condições M_{PEG} de 8000g/mol, C_{PEG} de 30% e C_{CIT} de 10% (ensaio 4, Tabela 4), foram selecionadas para a avaliação do efeito do pH sobre sua atividade devido aos altos valores de rendimento e de fator de purificação apresentados (404,432% e 6,256, respectivamente) para a protease com atividade colagenolítica. Tanto as amostras do extrato enzimático bruto (EB) quanto as enzimas em SDFA PEG/sulfato foram avaliadas quanto sua atividade proteásica e colagenolítica, a fim de aferir a influência do método de extração sobre a influência do pH na atividade enzimática bem como sobre sua estabilidade. Considerando aplicações industriais, a avaliação da estabilidade da atividade enzimática em diferentes níveis de pH é essencial para otimizar o seu uso e prolongar sua vida útil (SILVA, 2017).

A Figura 4 mostra o padrão de estabilidade da atividade proteásica em relação à variação de pH (4,0 – 11,0). Como pode-se observar, a enzima no EB apresenta um pico de atividade proteásica no pH 6,0, seguido de uma queda brusca nos demais níveis, mas manutenção de um mínimo de 60% de atividade até o pH 11,0. Por outro lado, as proteases extraídas no SDFA PEG/sulfato apresentaram uma faixa de pH ótimo, apresentando menor influência do pH sobre a atividade enzimática. Resultados similares foram encontrados por outros autores ao analisar o efeito do pH sobre proteases fúngicas. Biaggio et al. (2016), reportou uma faixa de atividade enzimática entre pH 5,0 a 8,0, com pH ótimo de 7,0 para peptidase de *Aspergillus terreus*.

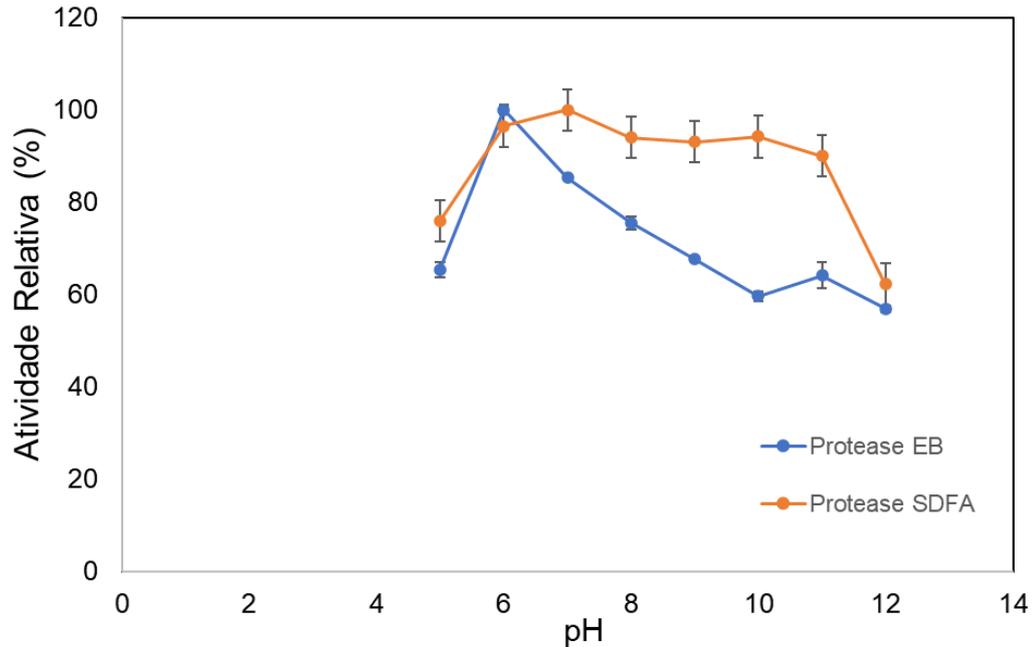


Figura 4. Comparação da estabilidade da atividade proteásica do extrato enzimático bruto (EB) em relação à enzima extraída em SDFa PEG/sulfato.

As proteases alcalinas representam mais de 50% da produção global de enzimas, encontram aplicações em variados segmentos industriais, como o processamento do couro, produção de detergentes e aditivos em produtos de limpeza, produção farmacêutica, reações de biotransformação, sínteses de peptídeos e tratamento de resíduos (BARZKAR, 2020).

Os resultados da análise do efeito do pH sobre a atividade colagenolítica estão apresentados na Figura 5. Ao contrário da atividade proteásica, o pico de atividade colagenolítica do extrato bruto ocorreu no pH 7,0, enquanto a maior atividade da enzima extraída por SDFa PEG/sulfato foi encontrada no pH 6,0. Ambas as amostras demonstraram diminuição de atividade nos demais níveis de pH, porém, nota-se que a extração em SDFa não apresentou um efeito importante no perfil da atividade enzimática.

De acordo com Wanderley et al. (2017), a faixa de pH ótimo encontrada para proteases colagenolíticas tende a variar de 5,0 a 10,0, sendo poucos os relatos de proteases colagenolíticas ácidas. Outros trabalhos corroboram com essa tendência. Pequeno et al. (2019), observaram que proteases colagenolíticas produzidas por *Bacillus cereus* se mantiveram estáveis entre o pH 7,2 e 11,0. Similarmente, Neto et al. (2018), obtiveram um pH ótimo de 9,0 para atividade colagenolítica de protease

produzida por *Penicillium aurantiogriseum*, com a manutenção de pelo menos 80% de atividade enzimática na faixa de pH entre 6,0 e 11,0.

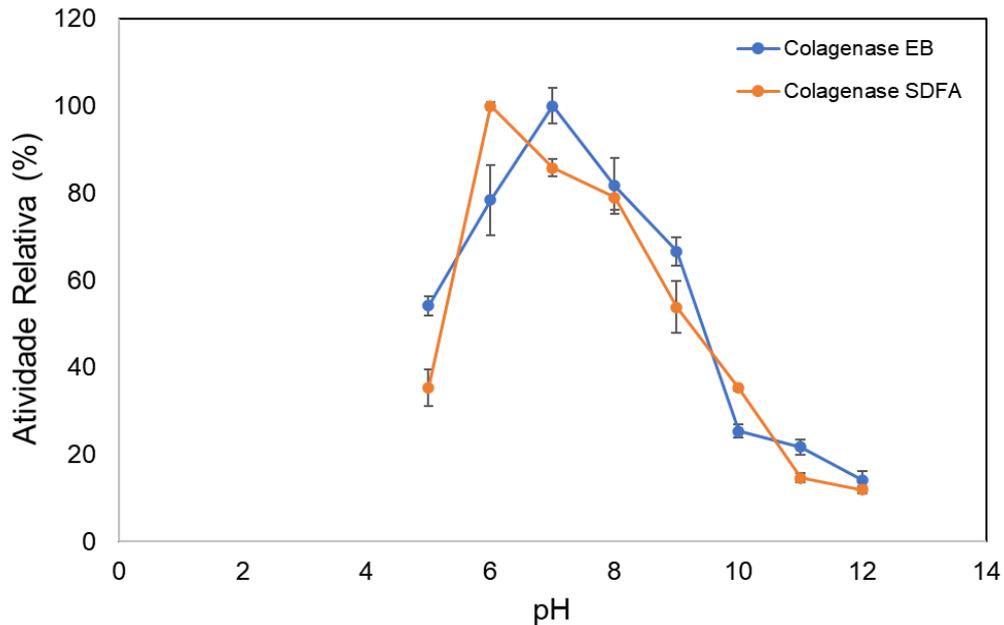


Figura 5. Comparação da estabilidade da atividade colagenolítica do extrato enzimático bruto (EB) em relação à enzima extraída em SDFA PEG/sulfato.

Os perfis de pH ótimo distintos quando foram utilizadas as atividades proteásica e colagenolítica faz com que seja levantada a hipótese da existência de duas proteases diferentes no extrato bruto enzimático. Além disso, o perfil de extração no SDFA para as duas atividades também foi diferente. Assim, mais estudos devem ser realizados para elucidar e/ou comprovar tal hipótese que se coloca neste trabalho

Os extratos enzimáticos (EB e SDFA) também foram analisados quanto a estabilidade da sua atividade proteásica em um intervalo de tempo de até 20 horas (0, 4, 8, 12, 16, 20h). Os resultados coletados estão expostos na Figura 6 e Figura 7, respectivamente. A partir da comparação das figuras, pode-se observar o efeito da extração em SDFA PEG/sulfato sobre a estabilidade da atividade proteásica.

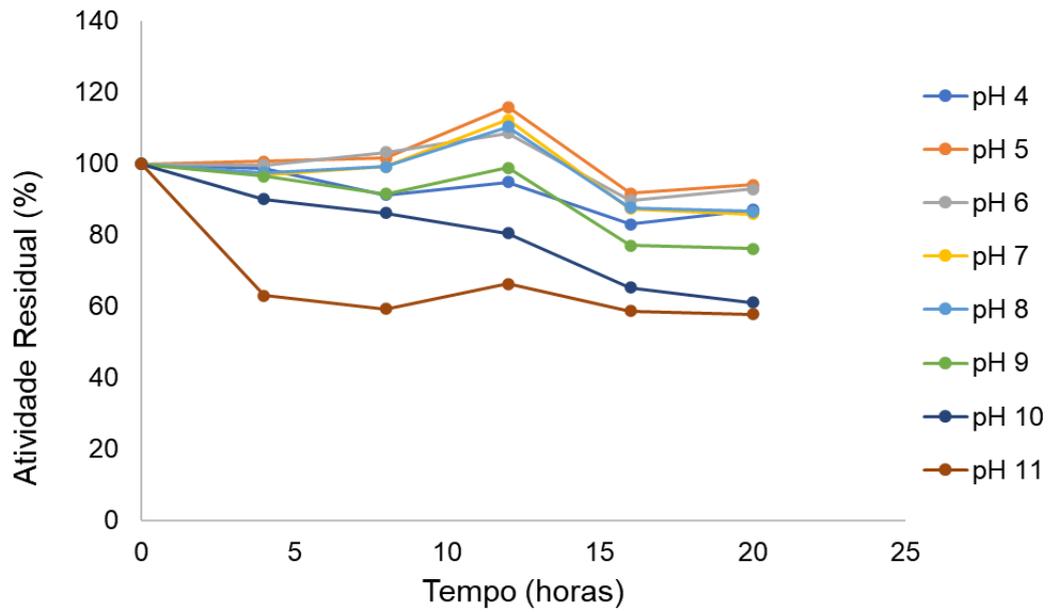


Figura 6. Efeito do pH sobre a estabilidade da atividade proteásica no extrato bruto (EB).

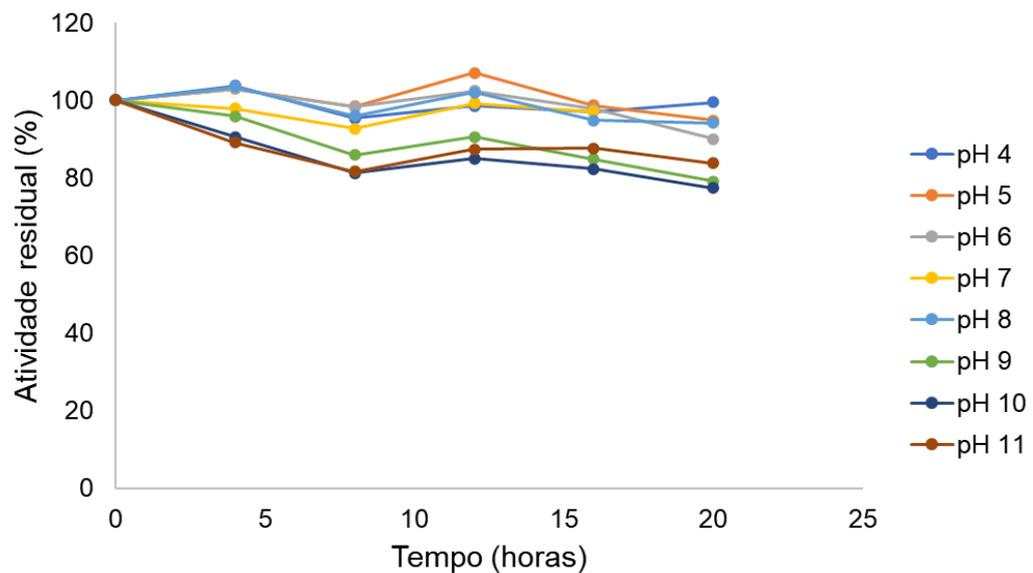


Figura 7. Efeito do pH sobre a estabilidade da atividade proteásica da enzima extraída em SDFA PEG/sulfato.

Na análise do extrato bruto (Figura 6), os níveis de pH mais alcalinos (9,0 - 11,0) não foram capazes de manter mais de 80% da sua atividade original até o fim do tempo determinado, especialmente o pH 10,0 e 11,0. Os demais níveis tiveram quedas menos acentuadas em suas atividades, se mostrando mais estáveis. As amostras de SDFA (Figura 7), por sua vez, apresentaram manutenção de mais de 80% da atividade proteásica após as 20 horas de incubação em todos os níveis de pH, exceto o pH 10,0, que apresentou uma leve queda. Nota-se que o SDFA

apresentou um efeito positivo sobre a estabilidade da protease, mantendo-a acima de 80% em uma faixa maior de níveis de pH.

Fernandes et al. (2020) observaram que proteases produzidas por *Aspergillus heteromorphus* URM 0269 e extraídas em SDFA PEG/citrato foram capazes de manter 60% de sua atividade enzimática inicial na faixa de pH entre 5,0 e 10,0 após 24 horas de incubação. Silva et al. (2018), relataram que proteases produzidas por *Aspergillus tamaritii* URM4634 se mantiveram estáveis entre o pH 7,0 e 11,0 após 24 horas de incubação. Outros autores, reportaram estabilidade de atividade proteásica em níveis de pH mais ácido. Sahili et al. (2017), obtiveram uma faixa de atividade proteásica entre o pH 3,0 e 10,0 após 96 horas de incubação.

3.4 Extração e caracterização do colágeno de cioba (*Lutjanus analis*)

A partir dos 30g de resíduo de pele utilizados para a extração, foram obtidos 2,417g de colágeno liofilizado, representando um rendimento de 80,57 mg/g de pele, ou 8,057% (peso seco). O rendimento obtido no presente trabalho foi superior àquele obtido por Arumugam et al. (2018), que ao realizar extração de colágeno a partir de resíduos de pele de solea (*Aseraggodes umbratilis*) pelo método ASC utilizando ácido acético em molaridade similar, obtiveram um rendimento máximo de 19,77mg/g de pele (1,926%). Um resultado similar foi reportado por Xu et al., (2017), que obtiveram um rendimento máximo de 9.38% (peso úmido) utilizando ácido acético para extrair colágeno a partir de resíduos de pele de tubarão.

3.5 Ensaio de capacidade hidrolítica

Os ensaios de hidrólise do colágeno extraído de resíduos de pele de cioba (*Lutjanus analis*) foram realizados utilizando o extrato bruto obtido a partir da fermentação em estado sólido por *A. heteromorphus* assim como a amostra da fase PEG proveniente do SDFA. Como pode-se observar na Figura 8, ambas amostras foram capazes de hidrolisar o colágeno extraído em proporções similares, obtendo um pico de hidrólise após 36 horas de tratamento.

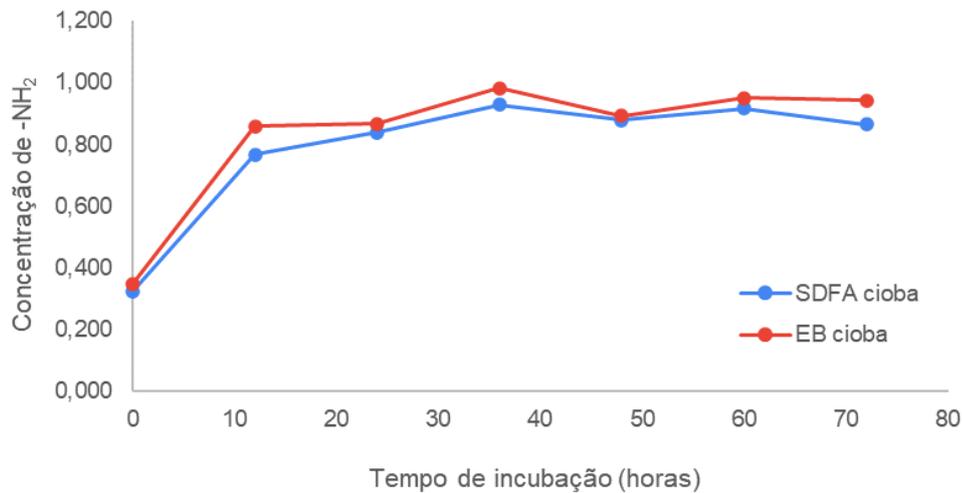


Figura 8. Hidrólise do colágeno extraído de cioba (*Lutjanus analis*) tratado com as amostras enzimáticas (extrato bruto e S DFA) em vários tempos de incubação (12, 24, 36, 48, 60 e 72 horas) a 37°C.

Ao utilizar o método colorimétrico com ninhidrina para analisar a digestão de colágeno de pele de salmão a partir do tratamento com protease extracelular de *Vibrio sp.* por 240 minutos, WU et al. (2018) concluíram que não houve aumento significativo no grau de hidrólise após 150 minutos de tratamento. Oliveira et al. (2017), obtiveram um pico de hidrólise após 48 horas de incubação ao analisar a hidrólise de colágeno de tendão de Aquiles bovino (colágeno tipo I) a partir do tratamento com proteases colagenolíticas extraídas de resíduos de pescada-branca (*Cynoscion leiarchus*).

Atualmente, a família de moléculas colagenosas consiste em 29 subtipos distintos, sendo os tipos I, II, III, IV e V os mais abundantes nos organismos, onde desempenham funções de sustentação e proteção dos tecidos, além de armazenamento e liberação de fatores de crescimento (BHUIIMBAR; BHAGWAT; DANDGE, 2019). O tipo I é o mais comum e o mais utilizado na indústria, sendo encontrado na pele, ossos, dentes, tendões e ligamentos; o tipo II pode ser encontrado em cartilagens; as fontes mais comuns para o colágeno tipo III são a pele, músculos e vasos sanguíneos; o tipo IV foi relatado na camada secretada pelo epitélio da membrana e lâmina basal; o colágeno tipo V é um dos principais componentes das superfícies celulares e da placenta (LEÓN-LÓPEZ et al., 2019).

Diferentes tipos de colágeno já foram extraídos a partir de resíduos (pele, escamas, cartilagem, ossos) de organismos aquáticos, com diferentes características,

propriedades e potenciais de aplicação (OLIVEIRA et al., 2017). Alguns exemplos incluem a extração de colágeno tipo I de ossos de *Thunnus obesus* (JEONG; VENKATESAN; KIM, 2013) e de *Priacanthus tayenus* (KITTIPHATTANABAWON et al., 2005), de pele de *Mystus macropterus* (ZHANG; LIULI, 2009), *Syngnathus schlegeli* (KHAN et al., 2009), e de escamas de *Trachurus trachurus* (MINH THUY; OKAZAKI; OSAKO, 2014), a extração de colágeno tipo II de cartilagem de *Carcharhinus limbatus* (KITTIPHATTANABAWON et al., 2010) e de resíduos de medusa (*Chrysaora* sp.) (BARZIDEH et al., 2013) e a extração de colágeno tipo IV de esponja marinha (*Callyspongiidae* sp.) (LIN et al., 2011).

4. CONSIDERAÇÕES FINAIS

A extração de proteases com atividade colagenolítica produzidas por *Aspergillus heteromorphus* URM0269 utilizando SDFA foi efetiva, com valores altos de purificação e recuperação (6,256 e 404,432%, respectivamente). O SDFA PEG/sulfato demonstrou um efeito positivo sobre a atividade enzimática das proteases fúngicas pela remoção de contaminantes presentes no extrato bruto. Além disso, foi observado que o SDFA foi benéfico para a estabilidade da atividade enzimática, propiciando a manutenção de uma porcentagem alta de atividade em diferentes níveis de pH por até 20 horas. Além disso, o ensaio de hidrólise do colágeno extraído de resíduos de pele de cioba (*Lutjanus analis*) evidenciou o potencial das proteases produzidas por *A. heteromorphus* para a hidólise de colágeno. Os resultados obtidos no presente trabalho, demonstraram que foi possível extrair proteases com excelente purificação e recuperação, bem como a ação da enzima hidrolisando o colágeno de cioba (*L. analis*), mas espera-se ainda elucidar as propriedades e potencial biológico dos hidrolisados produzidos.

5. REFERÊNCIAS

- ARAÚJO, R. et al. Partitioning of lactate dehydrogenase from bovine heart crude extract by polyethylene glycol–citrate aqueous two-phase systems. **Fluid Phase Equilibria**, v. 301, n. 1, p. 46-50, 2011.
- ARUMUGAM, G. et al. Extraction, optimization and characterization of collagen from sole fish skin. **Sustainable Chemistry and Pharmacy**, v. 9, p. 19-26, 2018.
- BARZIDEH, Z. et al. Isolation and characterisation of collagen from the ribbon jellyfish (*Chrysaora* sp.). **International Journal of Food Science & Technology**, v. 49, n. 6, p. 1490-1499, 2013.
- BARZKAR, N. Marine microbial alkaline protease: An efficient and essential tool for various industrial applications. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 161, p. 1216-1229, 2020.
- BIAGGIO, R. et al. Purification and biochemical characterization of an extracellular serine peptidase from *Aspergillus terreus*. **Preparative Biochemistry and Biotechnology**, v. 46, n. 3, p. 298-304, 2015.
- BHUIMBAR, M.; BHAGWAT, P.; DANDGE, P. Extraction and characterization of acid soluble collagen from fish waste: Development of collagen-chitosan blend as food packaging film. **Journal of Environmental Chemical Engineering**, v. 7, n. 2, p. 102983, 2019.
- BIŠKAUSKAITĖ, R.; VALEIKIENĖ, V.; VALEIKA, V. Enzymes for Leather Processing: Effect on Pickling and Chroming. **Materials**, v. 14, n. 6, p. 1480, 2021.
- BRADFORD, M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, v. 72, n. 1-2, p. 248-254, 1976.
- CHAVIRA, R.; BURNETT, T.; HAGEMAN, J. Assaying proteinases with azocoll. **Analytical Biochemistry**, v. 136, n. 2, p. 446-450, 1984.
- FERNANDES, L. et al. Purification and characterization of a novel *Aspergillus heteromorphus* URM 0269 protease extracted by aqueous two-phase systems PEG/citrate. **Journal of Molecular Liquids**, v. 317, p. 113957, 2020.
- HAMZA, T. Bacterial Protease Enzyme: Safe and Good Alternative for Industrial and Commercial Use. **International Journal of Chemical and Biomolecular Science**, v. 3, n. 3, p. 1-10, 2017.
- IQBAL, M. et al. Aqueous two-phase system (ATPS): an overview and advances in its applications. **Biological Procedures Online**, v. 18, n. 1, 2016.
- KAUR, O. *Aspergillus* and Cervicovaginal Papanicolaou Smear: A Review. **International Clinical Pathology Journal**, v. 4, n. 1, 2017.
- JEONG, H.; VENKATESAN, J.; KIM, S. Isolation and characterization of collagen from marine fish (*Thunnus obesus*). **Biotechnology and Bioprocess Engineering**, v. 18, n. 6, p. 1185-1191, 2013.
- KHAN, S. et al. Isolation and biochemical characterization of collagens from seaweed pipefish, *Syngnathus schlegeli*. **Biotechnology and Bioprocess Engineering**, v. 14, n. 4, p. 436-442, 2009.

- KITTIPHATTANABAWON, P. et al. Isolation and characterization of collagen from the cartilages of brownbanded bamboo shark (*Chiloscyllium punctatum*) and blacktip shark (*Carcharhinus limbatus*). **LWT - Food Science and Technology**, v. 43, n. 5, p. 792-800, 2010.
- KITTIPHATTANABAWON, P. et al. Characterisation of acid-soluble collagen from skin and bone of bigeye snapper (*Priacanthus tayenus*). *Food Chemistry*, v. 89, n. 3, p. 363-372, 2005.
- LEIGHTON, T. et al. The relationship of serine protease activity to RNA polymerase modification and sporulation in *Bacillus subtilis*. **Journal of Molecular Biology**, v. 76, n. 1, p. 103-122, 1973.
- LEÓN-LÓPEZ, A. et al. Hydrolyzed Collagen—Sources and Applications. **Molecules**, v. 24, n. 22, p. 4031, 2019.
- LIMA, C. et al. Two-phase partitioning and partial characterization of a collagenase from *Penicillium aurantiogriseum* URM4622: Application to collagen hydrolysis. **Biochemical Engineering Journal**, v. 75, p. 64-71, 2013.
- LIN, Z. et al. In vitro Evaluation of Natural Marine Sponge Collagen as a Scaffold for Bone Tissue Engineering. **International Journal of Biological Sciences**, v. 7, n. 7, p. 968-977, 2011.
- MINH THUY, L.; OKAZAKI, E.; OSAKO, K. Isolation and characterization of acid-soluble collagen from the scales of marine fishes from Japan and Vietnam. **Food Chemistry**, v. 149, p. 264-270, 2014.
- NASCIMENTO, T. et al. Purification of a fibrinolytic protease from *Mucor subtilissimus* UCP 1262 by aqueous two-phase systems (PEG/sulfate). **Journal of Chromatography B**, v. 1025, p. 16-24, 2016.
- OLIVEIRA, V. et al. Collagenase from smooth weakfish: extraction, partial purification, characterization and collagen specificity test for industrial application. **Boletim do Instituto de Pesca**, v. 43, n. 1, p. 52-64, 2017.
- NETO, J. et al. Single step purification via magnetic nanoparticles of new broad pH active protease from *Penicillium aurantiogriseum*. **Protein Expression and Purification**, v. 147, p. 22-28, 2018.
- PEQUENO, A. et al. Production and characterization of collagenase from a new Amazonian *Bacillus cereus* strain. **Preparative Biochemistry & Biotechnology**, v. 49, n. 5, p. 501-509, 2019.
- PORTO, T. et al. Liquid-liquid extraction of proteases from fermented broth by PEG/citrate aqueous two-phase system. **Chemical Engineering and Processing: Process Intensification**, v. 47, n. 4, p. 716-721, 2008.
- ROSSO, B. et al. Partitioning and extraction of collagenase from *Penicillium aurantiogriseum* in poly(ethylene glycol)/phosphate aqueous two-phase system. **Fluid Phase Equilibria**, v. 335, p. 20-25, 2012.
- SALIHI, A.; ASOODEH, A.; ALIABADIAN, M. Production and biochemical characterization of an alkaline protease from *Aspergillus oryzae* CH93. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 94, p. 827-835, 2017.
- SILVA, J.; DE FRANÇA, P.; PORTO, T. Optimized extraction of polygalacturonase from *Aspergillus aculeatus* URM4953 by aqueous two-phase systems PEG/Citrate. **Journal of Molecular Liquids**, v. 263, p. 81-88, 2018.

- SILVA, O. et al. Partitioning and extraction of protease from *Aspergillus tamarii* URM4634 using PEG-citrate aqueous two-phase systems. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 9, p. 168-173, 2017.
- SILVA, O. et al. Purification and characterization of a novel extracellular serine-protease with collagenolytic activity from *Aspergillus tamarii* URM4634. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 117, p. 1081-1088, 2018.
- SILVA, R. Bacterial and Fungal Proteolytic Enzymes: Production, Catalysis and Potential Applications. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 183, n. 1, p. 1-19, 2017.
- VARADAVENKATESAN, T. et al. Recovery of value-added products from wastewater using Aqueous Two-Phase Systems – A review. **Science of The Total Environment**, v. 778, p. 146293, 2021.
- WANDERLEY, M. et al. First report on *Chlorella vulgaris* collagenase production and purification by aqueous two-phase system. **Sustainable Chemistry and Pharmacy**, v. 15, p. 100202, 2020.
- WANDERLEY, M. et al. Purification and characterization of a collagenase from *Penicillium* sp. UCP 1286 by polyethylene glycol-phosphate aqueous two-phase system. **Protein Expression and Purification**, v. 133, p. 8-14, 2017.
- WU, R. et al. Antioxidant and anti-freezing peptides from salmon collagen hydrolysate prepared by bacterial extracellular protease. *Food Chemistry*, v. 248, p. 346-352, 2018.
- XU, S. et al. Purity and yield of collagen extracted from southern catfish (*Silurus meridionalis* Chen) skin through improved pretreatment methods. **International Journal of Food Properties**, v. 20, n. sup1, p. S141-S153, 2017.
- ZHANG, M.; LIU, W.; LI, G. Isolation and characterisation of collagens from the skin of largefin longbarbel catfish (*Mystus macropterus*). **Food Chemistry**, v. 115, n. 3, p. 826-831, 2009.

5. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Como evidenciado no capítulo 1, a análise bibliométrica é um meio eficiente de avaliar a evolução e as tendências atuais dentro de um campo de estudo. Na análise bibliométrica realizada, foi constatada a fragilidade da atual rede de colaborações e coautoria em publicações sobre peptídeos de colágeno de origem aquática. Isso pode ser explicado pela natureza relativamente recente da investigação de subprodutos de pescado como fontes de peptídeos de colágeno. A realização de análises desse tipo é de suma importância para o monitoramento do desenvolvimento da área de pesquisa ao longo do tempo.

No capítulo 2 dessa dissertação, a utilização de SDFA PEG/sulfato foi bem-sucedida para a extração de proteases com atividade colagenolíticas produzidas a partir da fermentação sólida por *Aspergillus heteromorphus* URM 0260 utilizando farelo de trigo como substrato, obtendo excelente purificação e recuperação. Além disso, a extração demonstrou um efeito positivo sobre a estabilidade da atividade enzimática, fator imprescindível para a sua utilização comercial. O ensaio de hidrólise utilizando colágeno extraído de resíduos de pele de cioba (*L. analis*) demonstrou ainda que tanto a amostra de extrato bruto proveniente da fermentação quanto a amostra da fase PEG obtida o SDFA foram capazes de hidrolisar o colágeno.

Tendo como base os resultados obtidos durante o desenvolvimento do presente trabalho, espera-se elucidar as propriedades e potencialidades de colágeno extraído e de seus hidrolisados através da realização de mais análises para sua caracterização. Ainda, espera-se que o presente trabalho impulse ainda mais investigações acerca do uso de resíduos pesqueiros como fontes de biomoléculas de interesse.