

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA  
CENTRO DE CIÊNCIAS RURAIS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA DOS  
ALIMENTOS

Alessandra Roseline Vidal

**AVALIAÇÃO DAS PROPRIEDADES FUNCIONAIS E ESTRUTURAIS  
DE HIDROLISADOS DE DIFERENTES COLÁGENOS BOVINOS  
OBTIDOS POR HIDRÓLISE ENZIMÁTICA ASSISTIDA POR  
ULTRASSOM**

Santa Maria, RS  
2016

**Alessandra Roseline Vidal**

**AVALIAÇÃO DAS PROPRIEDADES FUNCIONAIS E ESTRUTURAIS DE  
HIDROLISADOS DE DIFERENTES COLÁGENOS BOVINOS OBTIDOS POR  
HIDRÓLISE ENZIMÁTICA ASSISTIDA POR ULTRASSOM**

Dissertação apresentada ao Curso de Mestrado do Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia dos Alimentos, Área de Concentração em Ciência e Tecnologia dos Alimentos, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para a obtenção do grau de **Mestre em Ciência e Tecnologia dos Alimentos**.

Orientadora: Prof<sup>ª</sup> Dr<sup>ª</sup>. Rosa Cristina Prestes Dornelles

Santa Maria, RS  
2016

**Alessandra Roseline Vidal**

**AVALIAÇÃO DAS PROPRIEDADES FUNCIONAIS E ESTRUTURAIS DE  
HIDROLISADOS DE DIFERENTES COLÁGENOS BOVINOS OBTIDOS POR  
HIDRÓLISE ENZIMÁTICA ASSISTIDA POR ULTRASSOM**

Dissertação apresentada ao Curso de Mestrado do Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia dos Alimentos, Área de Concentração em Ciência e Tecnologia dos Alimentos, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para a obtenção do grau de **Mestre em Ciência e Tecnologia dos Alimentos**.

**Aprovado em 26 de agosto de 2016:**

---

**Rosa Cristina Prestes Dornelles, Dr<sup>a</sup>. (UFSM)**  
(Presidente/Orientadora)

---

**Rogério Luis Cansian, Dr<sup>o</sup>. (URI)**  
(Co-orientador)

---

**Ivo Mottin Demiate, Dr<sup>o</sup>. (UEPG)**

---

**Renius de Oliveira Mello, Dr<sup>o</sup>. (UFSM)**

Santa Maria, RS  
2016

## AGRADECIMENTOS

Á Deus, pela sua companhia em todos os momentos.

A professora Dr.<sup>a</sup> Rosa Cristina Prestes Dornelles pela orientação, ensinamentos, oportunidades de inserção na pesquisa, dedicação, apoio, incentivo ao crescimento acadêmico e amizade ao longo da graduação e pós-graduação: Obrigada!

Ao Dr. Ernesto Hashime Kubota pelo auxílio e ensinamentos nas minhas atividades de pesquisa. Por ser um exemplo de profissional dedicado, solidário e ético. Obrigada!

Ao Dr. Renius de Oliveira Mello pela contribuição nas análises estatísticas de minha dissertação, pela ajuda nos experimentos realizados, pelos ensinamentos, disponibilidade e apoio. Obrigada!

Ao Dr. Rogério Luis Cansian pela realização das análises microbiológicas, pela oportunidade de aprendizado de novas técnicas laboratoriais e excelente recepção em seu local de trabalho. Obrigada!

Ao Dr. Ivo Mottin Demiate pela realização da análise de FTIR e tratamento dos dados. Pela oportunidade de novas experiências e aprendizado. Pela confiança e dedicação. Obrigada!

Ao Dr. Acácio Antonio Ferreira Zielinski pela realização da análise estatística referente aos espectros de FTIR. Pela colaboração, dedicação e disponibilidade. Obrigada!

Aos professores da PGCTA pelos ensinamentos, dedicação e empenho ao longo da pós-graduação.

A minha família pelo companheirismo e apoio, em especial a minha mãe, mulher trabalhadora, íntegra, dedicada, fonte de inspiração para minha caminhada.

Ao meu namorado Eduardo pelo amor, dedicação, companheirismo, incentivo; por cuidar de mim e estar ao meu lado.

Aos meus amigos (as) e colegas de pesquisa, em especial, Michele M. Schmidt, Adrenizi Donaduzzi, Karem Vieira, Thaísa E. Ferreira, Carine F. Cechin, Luciene Guilhermano, Gabriela V. Mello, Bernardo Araújo, Gabriel Bassaco, pela ajuda, dedicação, companheirismo e empenho ao longo das atividades desenvolvidas. Obrigada!

Aos funcionários do DTCA pela disponibilidade e ensinamentos transmitidos.

A Universidade Federal de Santa Maria pela possibilidade de crescimento profissional, acadêmico e disponibilidade de uso dos equipamentos e instalações.

A Universidade Estadual de Ponta Grossa e a Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e das Missões pela ajuda com as análises de espectroscopia na região do infravermelho com transformada de Fourier, antimicrobianas e eletroforese.

A FAPERGS e ao CNPQ pela ajuda financeira para aquisição de equipamentos e de reagentes, como também de bolsas de iniciação científica.

As empresas Novaprom e Rousselot pela doação das amostras utilizadas nesse estudo.

A CAPES pela bolsa de pós-graduação.

E a todos que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho, muito obrigada.

When I find myself in times of trouble  
Mother Mary comes to me  
Speaking words of wisdom, let it be

And in my hour of darkness  
She is standing right in front of me  
Speaking words of wisdom, let it be  
(...)

And when the night is cloudy  
There is still a light that shines on me  
Shine on until tomorrow, let it be

I wake up to the sound of music  
Mother Mary comes to me  
Speaking words of wisdom, let it be  
(...)

Let it be, let it be  
Let it be, yeah let it be  
Whisper words of wisdom, let it be

**Let it be**

**The Beatles**

*Composer: John Lennon and Paul McCartney*

## RESUMO

### **AVALIAÇÃO DAS PROPRIEDADES FUNCIONAIS E ESTRUTURAIS DE HIDROLISADOS DE DIFERENTES COLÁGENOS BOVINOS OBTIDOS POR HIDRÓLISE ENZIMÁTICA ASSISTIDA POR ULTRASSOM**

AUTORA: Alessandra Roseline Vidal

ORIENTADORA: Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Rosa Cristina Prestes Dornelles

Foi avaliado as propriedades funcionais e estruturais de hidrolisados de diferentes colágenos bovinos obtidos por hidrólise enzimática assistida por ultrassom. Foram utilizadas nas hidrólises seis diferentes amostras comerciais de colágeno bovino: fibra, fibra pó, hidrolisado 1, hidrolisado 2, gelatina 1 e gelatina 2 e três diferentes enzimas: Alcalase<sup>®</sup>, Flavourzyme<sup>®</sup> e pepsina. Foram realizadas análises físico-químicas, de composição estrutural (espectroscopia na região do infravermelho com transformada de Fourier), grau de hidrólise, atividade antioxidante e atividade antimicrobiana. Houve diferença significativa ( $p < 0,05$ ) para umidade, cinzas, proteínas, lipídios, pH, hidroxiprolina e colágeno para as diferentes amostras brutas. A utilização do ultrassom prévio ou concomitante potencializou a hidrólise enzimática das amostras, gerou maior quantidade de bandas em número de onda ( $\text{cm}^{-1}$ ). Quando do uso da enzima Alcalase<sup>®</sup>, a hidrólise enzimática (16% de enzima) e o ultrassom prévio, aplicados as amostras (com exceção das amostras fibra e fibra pó) provocaram menores teores de proteínas residuais, maior grau de hidrólise e maior atividade antioxidante. A amostra hidrolisado 1 apresentou o menor teor de proteína residual (7,06 mg/mL), hidrolisado 2 o maior grau de hidrólise (10,3%) e gelatina 1 a maior atividade antioxidante (66,2%). Na aplicação da enzima Flavourzyme<sup>®</sup>, a hidrólise enzimática e o ultrassom concomitante levaram a menores teores de proteína residual e maior grau de hidrólise, onde a amostra hidrolisado 1 foi a que apresentou maior atividade antioxidante (52,2%), referente ao tratamento utilizando apenas enzima. Na aplicação da enzima pepsina, a amostra hidrolisado 1 apresentou o menor teor de proteína residual (4,50 mg/mL), a amostra fibra o maior valor de grau de hidrólise (21,7%) e a amostra gelatina 2 o maior valor de atividade antioxidante (53,7%). Os menores teores de proteína residual foram decorrentes da maior hidrólise da estrutura proteica das amostras, ocasionadas pelos diferentes componentes dos tratamentos. As amostras que sofreram maior rompimento de suas ligações peptídicas apresentaram maior grau de hidrólise. Os hidrolisados com maiores valores de grau de hidrólise nem sempre apresentaram bons valores de atividade antioxidante, pois a geração de peptídeos de alta funcionalidade é o que determina estes valores. O ultrassom prévio foi melhor quando da utilização da enzima Alcalase<sup>®</sup>, utilizando uma concentração de 16% sobre o substrato. Para a enzima Flavourzyme<sup>®</sup> a utilização do ultrassom que proporcionou melhores resultados foi a concomitante a hidrólise enzimática. Já para a enzima pepsina a utilização das diferentes aplicações do ultrassom não acarretou em diferenças significativas nos resultados obtidos. A enzima Alcalase<sup>®</sup> proporcionou os maiores valores de atividade antioxidante, enquanto que a enzima Flavourzyme<sup>®</sup> os maiores valores de grau de hidrólise, e a pepsina a menor média de proteína residual. Os hidrolisados obtidos dos tratamentos que utilizaram a enzima pepsina na hidrólise apresentam maior inibição das bactérias *Salmonella choleraesuis* e *Staphylococcus aureus* em concentrações menores que 10%. Diante do exposto, pode-se concluir que as enzimas e as diferentes aplicações do ultrassom proporcionaram maior rompimento estrutural das amostras e aumento da funcionalidade dos hidrolisados (atividade antioxidante e antimicrobiana) de diferentes colágenos bovinos.

**Palavras-chave:** Atividade antioxidante. Atividade antimicrobiana. Ultrassom. FTIR. Hidrólise enzimática. Colágeno bovino.

## ABSTRACT

### EVALUATION OF FUNCTIONAL AND STRUCTURAL PROPERTIES OF DIFFERENT BOVINE COLLAGENS OBTAINED THROUGH ULTRASOUND ASSISTED ENZYMATIC HYDROLYSIS

AUTHOR: Alessandra Roseline Vidal

ADVISOR: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Rosa Cristina Prestes Dornelles

The objective of this study was to evaluate the functional and structural properties of different bovine collagen hydrolysates obtained through ultrasound assisted enzymatic hydrolysis. Six different samples of commercial bovine collagen were used in the hydrolyses: fiber, powder fiber, hydrolysate 1, hydrolysate 2, gelatin 1 and gelatin 2 along with three different enzymes: Alcalase<sup>®</sup>, Flavourzyme<sup>®</sup> and pepsin. The analyses carried out were: physical-chemical, structural composition (Fourier transform infrared spectroscopy), hydrolysis degree, antioxidant and antimicrobial activity. Significant difference ( $p < 0.05$ ) was found for humidity, ashes, proteins, lipids, pH, hydroxyproline and collagen in the different crude samples. The use of previous or simultaneous ultrasound strengthened the enzymatic hydrolysis of the samples, generating larger number of bands in wave numbers ( $\text{cm}^{-1}$ ). Regarding the use of the enzyme Alcalase<sup>®</sup>, the enzymatic hydrolysis (16% enzyme) and previous ultrasound, applied to the samples (except for the fiber and powder fiber samples) resulted in lower residual protein content, higher hydrolysis degree and higher antioxidant activity. The hydrolysate 1 sample presented the lowest residual protein content (7.06 mg/mL), while hydrolysate 2 presented the highest hydrolysis degree (10.3%) and the gelatin 1 sample had the highest antioxidant activity (66.2%). When using the enzyme Flavourzyme<sup>®</sup>, the enzymatic hydrolysis and simultaneous ultrasound led to lower residual protein content and higher hydrolysis degree, and the hydrolysate 1 sample was the one with the highest antioxidant activity (52.2%) in the treatment that used enzyme only. When the enzyme pepsin was employed, the hydrolysate 1 sample presented the lowest residual protein content (4.50 mg/mL), while the Fiber sample had the highest hydrolysis degree value (21.7%) and the gelatin 2 sample showed the highest antioxidant activity value (53.7%). The lowest residual protein content resulted from the higher hydrolysis of the protein structure of the samples, due to the different treatment components. The samples that suffered highest rupture of their peptide bonds presented higher hydrolysis degree. The hydrolysates with the highest hydrolysis degree values not always presented good values of antioxidant activity, since the generation of high functionality peptides is what determines these values. Previous ultrasound worked better than the simultaneous one when the enzyme Alcalase<sup>®</sup> was used, applying a 16% concentration to the substrate. For the enzyme Flavourzyme<sup>®</sup>, the use of ultrasound did not result in significant difference in the results obtained. The enzyme Alcalase<sup>®</sup> provided the highest antioxidant activity values, while the enzyme Flavourzyme<sup>®</sup> presented the highest hydrolysis degree values, and pepsin showed the lowest residual protein average. The hydrolysates obtained from the treatments with the enzyme pepsin in the hydrolysis presented the highest inhibiting action against the bacteria *Salmonella choleraesuis* and *Staphylococcus aureus* in lower-than-10% concentrations. Therefore, enzymes and different ultrasound applications were concluded to provide higher structural rupture of samples and increase in the functionality of different bovine collagen hydrolysates (antioxidant and antimicrobial activities).

**Keywords:** Antioxidant activity. Antimicrobial activity. Ultrasound. FTIR. Enzymatic hydrolysis. Bovine collagen.

**LISTA DE FIGURAS****Artigo I**

Fig. 1 - Dispersão tridimensional da parcela obtida pela PCA com base na região 500-1722  $\text{cm}^{-1}$  .....67

**Artigo II**

Fig. 1 - Dispersão tridimensional da parcela obtida pela PCA com base na região 500-1722  $\text{cm}^{-1}$  .....97

**Artigo III**

Fig. 1 - Dispersão tridimensional da parcela obtida pela PCA com base na região 500-1722  $\text{cm}^{-1}$  .....127

## LISTA DE TABELAS

### Artigo I

Tabela 1 – Diferentes tipos de colágenos bovinos utilizados para obtenção de hidrolisados protéicos.....	64
Tabela 2 – Tratamentos utilizados para obtenção dos hidrolisados proteicos de colágeno bovino.....	65
Tabela 3 – Teores médios de umidade, cinzas, proteínas, lipídios, pH, hidroxiprolina e colágeno para os diferentes tipos de colágeno.....	66
Tabela 4 – Valores probabilísticos para avaliar o efeito do ultrassom prévio ou concomitante a aplicação da enzima Alcalase <sup>®</sup> sobre as variáveis proteína (mg/mL), grau de hidrólise (%), e atividade antioxidante (%)......	68
Tabela 5 - Coeficientes da correlação de Spearman entre as variáveis proteína (mg/mL) e grau de hidrólise (%) e atividade antioxidante (%) dos hidrolisados de colágeno.....	69
Tabela 6 – Resultados médios de proteína, grau de hidrólise e atividade antioxidante para as amostras de hidrolisados de colágeno, avaliando a interação enzima vs. ultrassom.....	70
Tabela 7 - Valores probabilísticos para avaliar o efeito do ultrassom (sem e com), da enzima (0, 8 e 16%) e dos diferentes tipos de colágeno sobre as variáveis proteína (mg/mL), grau de hidrólise (%) e atividade antioxidante (%)......	71
Tabela 8 - Coeficientes da correlação de Spearman entre as variáveis proteína (mg/mL), grau de hidrólise (%) e atividade antioxidante (%) dos hidrolisados de colágeno.....	72
Tabela 9 – Resultados médios de proteína, grau de hidrólise e atividade antioxidante para as diferentes amostras de hidrolisados de colágeno.....	73

### Artigo II

Tabela 1 – Diferentes tipos de colágenos bovinos utilizados para obtenção de hidrolisados protéicos.....	95
Tabela 2 – Tratamentos de hidrólise utilizados para obtenção dos hidrolisados proteicos de diferentes colágenos bovinos.....	96
Tabela 3 - Valores probabilísticos para avaliar o efeito do ultrassom prévio ou concomitante a aplicação da enzima Flavourzyme <sup>®</sup> sobre as variáveis proteína (mg/mL), grau de hidrólise (%), e atividade antioxidante (%)......	98
Tabela 4 - Coeficientes da correlação de Spearman entre as variáveis proteína (mg/mL), grau de hidrólise (%) e atividade antioxidante (%) dos hidrolisados de colágeno.....	99
Tabela 5 - Médias totais de proteína, grau de hidrólise e atividade antioxidante para as amostras de hidrolisados de colágeno, avaliando o efeito do ultrassom na hidrólise enzimática.....	100
Tabela 6 - Valores probabilísticos para avaliar o efeito do ultrassom (concomitante), da enzima (0 e 8%) e dos diferentes tipos de colágeno sobre as variáveis proteína (mg/mL), grau de hidrólise (%) e atividade antioxidante (%)......	101
Tabela 7 - Coeficientes da correlação de Spearman entre as variáveis proteína (mg/mL), grau de hidrólise (%) e atividade antioxidante (%) dos hidrolisados de colágeno.....	102

Tabela 8 – Médias de proteína, grau de hidrólise e atividade antioxidante para as diferentes amostras de hidrolisados de colágeno.....	103
Tabela 9 - Concentração Inibitória Mínima (CIM), dos hidrolisados de diferentes colágenos bovinos, necessária para inibição da bactéria Gram-negativa ( <i>Salmonella choleraesuis</i> - ATTC 10708) e Gram-positiva ( <i>Staphylococcus aureus</i> - ATTC 6538).....	104

### **Artigo III**

Tabela 1 – Diferentes tipos de colágenos bovinos utilizados para obtenção dos hidrolisados proteicos.....	125
Tabela 2 – Tratamentos utilizados para obtenção dos hidrolisados proteicos de colágenos bovinos.....	126
Tabela 3 - Valores probabilísticos para avaliar o efeito do ultrassom prévio ou concomitante a hidrólise enzimática com pepsina sobre as variáveis proteína (mg/mL), grau de hidrólise (%), e atividade antioxidante (%).....	128
Tabela 4 - Coeficientes de correlação de Spearman entre as variáveis proteína (mg/mL), grau de hidrólise (%) e atividade antioxidante (%) dos hidrolisados de colágeno.....	129
Tabela 5 – Médias totais de proteína, grau de hidrólise e atividade antioxidante para as amostras de hidrolisados de colágeno, avaliando o efeito do ultrassom na hidrólise enzimática.....	130
Tabela 6 - Valores probabilísticos para avaliar o efeito do ultrassom (concomitante), da enzima (0 e 4%) e dos diferentes tipos de colágeno sobre as variáveis proteína (mg/mL), grau de hidrólise (%) e atividade antioxidante (%).....	131
Tabela 7 - Coeficientes da correlação de Spearman entre as variáveis proteína (mg/mL), grau de hidrólise (%) e atividade antioxidante (%) dos hidrolisados de colágeno....	132
Tabela 8 – Médias de proteína e grau de hidrólise para as diferentes amostras de hidrolisados de colágenos bovinos.....	133
Tabela 9 – Médias de atividade antioxidante para as diferentes amostras de hidrolisados de colágenos bovinos.....	134
Tabela 10 - Concentração Inibitória Mínima (CIM), dos diferentes hidrolisados de colágeno, necessária para inibição da bactéria Gram-negativa ( <i>Salmonella choleraesuis</i> - ATTC 10708) e Gram-positiva ( <i>Staphylococcus aureus</i> - ATTC 6538).....	135

**LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS**

AA	Atividade antioxidante
ANOVA	Análise de variância univariada
CIM	Concentração inibitória mínima
DPPH	1,1-difenil-2-picrilhidrazil
EH	Hidrólise enzimática
EHU	Hidrólise enzimática concomitante ao uso do ultrassom
EWP	Proteína da clara do ovo
FTIR	Espectroscopia na região do infravermelho com transformada de Fourier
GEL	Gelita
GH	Grau de hidrólise
HCA	Análise de grupamento hierárquico
HU	Hidrólise com ultrassom
LB	Luria Bertani
PCA	Análise de componentes principais
PEP	Peptan
pH	Potencial hidrogeniônico
PTL	Peptiplus
ptn	Proteína
ROU	Rousselot
UEH	Tratada com ultrassom prévio seguida de hidrólise enzimática
UFC	Unidade formadora de colônia
US	Ultrassom
UV	Ultravioleta

## SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS .....	11
LISTA DE TABELAS .....	12
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS .....	14
SUMÁRIO.....	15
I. CAPÍTULO.....	17
1. Introdução.....	17
2. Objetivos.....	19
2.1 Objetivo geral .....	19
2.2 Objetivos específicos.....	19
3. Revisão Bibliográfica .....	20
3.1 Colágeno.....	20
3.1.1 Colágeno parcialmente hidrolisado (gelatina).....	21
3.1.2 Colágeno hidrolisado.....	22
3.1.3 Fibra de colágeno e fibra de colágeno em pó.....	22
3.2 Hidrólise enzimática.....	22
3.2.1 Proteases e collagenases .....	23
3.3 Ultrassom .....	24
3.4 Alimentos funcionais.....	26
3.4.1 Peptídeos bioativos .....	27
3.4.2. Atividade antioxidante.....	28
3.4.3 Atividade antimicrobiana .....	29
3.5 Técnicas de caracterização estrutural de proteínas .....	30
3.5.1 Espectroscopia na região do infravermelho com transformada de Fourier (FTIR).....	30
3.5.2 Análise Multivariada: Análise de Componentes Principais (PCA).....	31
Referências Bibliográficas.....	33

II. CAPÍTULO .....	42
4. Artigo I .....	42
III. CAPÍTULO.....	75
5. Artigo II.....	75
IV. CAPÍTULO.....	105
6. Artigo III.....	105
V. CAPÍTULO.....	135
7. Considerações Finais .....	135
8. Sugestão de trabalhos futuros .....	136
APÊNDICES .....	137

# I. CAPÍTULO

## 1. INTRODUÇÃO

Há um crescente interesse pelos processos de extração do colágeno e seus derivados [1] devido à tendência de utilização desta proteína em substituição aos agentes sintéticos nos mais diversos processos industriais e também por permitir uma maior valorização dos subprodutos do abate de animais de açougue. Os colágenos podem ser encontrados em todos os tecidos conjuntivos de organismos multicelulares, principalmente em tendões, cartilagens, ligamentos, músculos, ossos desmineralizados, sistema vascular e outros órgãos de vertebrados, compreendendo uma grande e diversificada família de proteínas [2], sendo a proteína de origem animal mais encontrada, representando aproximadamente 30% do total de proteínas [3].

Pesquisas envolvendo a obtenção, fracionamento e caracterização de hidrolisados e peptídeos de colágeno [1] focaram nas propriedades funcionais destes compostos. A hidrólise enzimática através de proteases animais ou vegetais [4-6] aplicada a subprodutos do abate de bovinos possibilitou a obtenção de peptídeos derivados do colágeno, agregando valor a esses resíduos [4, 7]. A especificidade, o controle do grau de hidrólise, as condições moderadas de ação e o menor conteúdo de sal no hidrolisado final são algumas das vantagens da utilização de proteases específicas na hidrólise de colágenos. Não obstante, as enzimas podem ser usadas em menores quantidades e não necessitam de remoção ao final do processo [8]. A hidrólise enzimática possui a capacidade de modificar uma variedade de grupos funcionais, sendo utilizada para aumentar funcionalidade das proteínas através da modificação estrutural [9, 10].

Pesquisas recentes mostraram que o ultrassom pode modificar a estrutura e as propriedades funcionais das proteínas alimentares [11-14], principalmente aquelas de origem animal [15, 16]. Pode causar aumento na atividade enzimática pela melhor ligação substrato-enzima e exposição do sítio ativo da enzima. Quando utilizado como pré-tratamento e/ou concomitante ao processo de hidrólise, afeta as ligações de hidrogênio e interações hidrofóbicas, rompendo estruturas terciárias e quaternárias das proteínas devido aos efeitos de cavitação. Essas modificações estruturais possibilitam o acesso da enzima à estrutura, causando um aumento no grau de hidrólise e da bioatividade [17].

A realização de estudos com o intuito de obter diferentes hidrolisados de colágenos permite que os peptídeos encontrados sejam utilizados para enriquecer alimentos ou

consumidos como alimentos nutraceuticos. Os hidrolisados obtidos de colágeno ou da própria carne apresentam menor amargor e *off-flavor*, comparados aos obtidos de outras fontes.

As propriedades antioxidantes dos hidrolisados podem refletir na redução da formação de radicais livres, oxidação da gordura e aumentar a atividade de enzimas como a glutathione peroxidase, catalase e superóxido dismutase, responsáveis pelo controle da oxidação de células humanas. A atividade antimicrobiana dos hidrolisados pode permitir num futuro a redução ou a utilização dos mesmos como uma alternativa aos conservantes tradicionais.

Poucos estudos exploraram as diferenças entre os diversos tipos de subprodutos de colágenos bovinos (fibra, gelatina e colágeno hidrolisado) e avaliaram os efeitos da hidrólise enzimática (usando diferentes enzimas: Alcalase<sup>®</sup>, Flavourzyme<sup>®</sup> e pepsina) assistida por ultrassom sobre as propriedades funcionais e estruturais de hidrolisados proteicos, revelando a necessidade de novos estudos. Diante do exposto, torna-se necessário o estudo dos hidrolisados, de suas propriedades funcionais e estruturais, pois permitem o desenvolvimento de ingredientes ou alimentos que podem melhorar a dieta e contribuir para a saúde humana, além de agregar valor a estes produtos.

## 2. OBJETIVOS

### 2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar as propriedades funcionais e estruturais de hidrolisados de diferentes colágenos bovinos obtidos por hidrólise enzimática assistida por ultrassom.

### 2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Caracterizar os diferentes colágenos bovinos;
- Obter hidrolisados integrais através de diferentes processos de hidrólise;
- Avaliar as características estruturais dos hidrolisados através da análise de espectroscopia na região do infravermelho com transformada de Fourier (FTIR), utilizando como recurso para verificação das semelhanças entre os espectros obtidos a análise multivariada de componentes principais (PCA);
- Avaliar o grau de hidrólise, a atividade antioxidante e antimicrobiana dos hidrolisados.

### 3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Neste tópico será apresentada a fundamentação teórica e revisão bibliográfica sobre o colágeno e seus diferentes tipos; sobre a hidrólise enzimática utilizando diferentes proteases para obtenção de hidrolisados; sobre o ultrassom, tecnologia que vem sendo muito utilizada em processos que envolvem extração e hidrólise de proteínas; sobre alimentos funcionais, dentre eles os peptídeos bioativos, os quais apresentam atividade antioxidante e antimicrobiana; e por fim, sobre a análise de espectroscopia na região do infravermelho com transformada de Fourier (FTIR) juntamente com a análise estatística de componentes principais (PCA) utilizados como ferramenta para caracterizar os hidrolisados estruturalmente e facilitar a visualização de semelhanças entre eles.

#### 3.1 COLÁGENO

O termo colágeno provém dos termos gregos KOLLA (cola) e GENNO (produção) [18]. O colágeno é uma molécula estrutural localizada na matriz extracelular [19], possuindo um ou mais domínios característicos com conformação em tríplice hélice, apresentando três cadeias repetitivas de aminoácidos Gly-X-Y (prolina na posição X da trinca repetitiva Gly-X-Y e hidroxiprolina na posição Y) [20-22]. Três cadeias polipeptídicas (duas  $\alpha_1$  e uma  $\alpha_2$ ) que compõem a tríplice hélice formam a molécula de colágeno [23], a qual apresenta em suas extremidades sequências não helicoidais. Foram citados na literatura até o momento 29 diferentes tipos de colágenos [24], tendo cada tipo sua sequência e composição de aminoácidos, apresentam estruturas distintas e desempenham funções específicas [20].

O colágeno pode ser encontrado sob diversas formas em tecidos de organismos multicelulares, sendo a proteína dominante no tecido conjuntivo, podendo desempenhar diversas funções de acordo com sua localização [2]. O colágeno representa cerca de 30% de toda a matéria orgânica do corpo de animais [3]. As proteínas são moléculas altamente funcionais, sendo sua funcionalidade vinculada a sua estrutura molecular, responsável por suas interações [25]. O crescente interesse pelo processo de obtenção, fracionamento e caracterização de colágenos e seus derivados [1] se deve às propriedades funcionais desses compostos e a possibilidade de utilização como substituintes de agentes sintéticos nos mais diversos processos industriais [5].

O colágeno pode sofrer modificações químicas através da esterificação, acilação, desaminação de grupos amino de lisina ou proteção de grupos guanidino dos resíduos de arginina [26]. A partir do colágeno nativo podem ser obtidos: fibra de colágeno, colágeno parcialmente hidrolisado (gelatina) e colágeno hidrolisado.

### 3.1.1 Colágeno parcialmente hidrolisado (gelatina)

O colágeno, inicialmente insolúvel em água, passa a ser solúvel após sofrer processo de hidrólise controlada (65 a 68 °C), dando origem à gelatina [27-30]. Na conversão do tropocolágeno em gelatina ocorrem rupturas de ligações de hidrogênio, responsáveis pela estabilização da tripla hélice, formando uma configuração ao acaso.

A gelatina pode ser classificada em três diferentes tipos:  $\alpha$ , composta de apenas uma cadeia peptídica, com massa molecular de 80.000 a 125.000 Da;  $\beta$ , formada por duas cadeias peptídicas entrelaçadas, com massa molecular de 160.000 para 250.000 Da; e  $\gamma$ , formada por três cadeias interconectadas, com massa molecular de 240.000 a 375.000 Da [27, 31].

No processo de transformação do colágeno em gelatina ocorre a ruptura de um número limitado de peptídeos, a ruptura ou desorganização das ligações entre as cadeias laterais e a mudança na configuração da cadeia, sendo esta última etapa fundamental para conversão de colágeno em gelatina [29, 32]. As características da gelatina obtida dependem das condições empregadas em sua produção. A gelatina pode ser obtida através da hidrólise ácida ou alcalina. O processo alcalino é amplamente utilizado para o pré-tratamento de couro bovino e o processo ácido para a pele suína e ossos [33].

A extração ácida da origem a gelatina do Tipo A, a qual apresenta ponto isoelétrico entre 7 e 9. Provoca a reorganização física da estrutura do colágeno e mínimas alterações hidrolíticas, gerando ampla faixa de distribuição de massa molar. Consequentemente ocorre o ligeiro aumento de grupos amino primários e de grupos carboxílicos livres. A gelatina obtida deste processo apresenta massa molar entre 70.000 e 90.000 Da [27, 29, 30, 34, 35].

A hidrólise alcalina dá origem a gelatina Tipo B, apresentando ponto isoelétrico entre 4,7 e 5,5. A hidrólise alcalina é um processo drástico, a ponto de hidrolisar até mesmo aminoácidos, resultando em menor faixa de distribuição de massa molar. O meio de extração alcalino faz com que as substâncias distintas do colágeno, queratina, globulinas, mucopolissacarídeos, elastina, mucina e albuminas, modifiquem-se, tornando-se solúveis. Os lipídeos se tornam produtos polares, sendo removidos facilmente em processo de lavagem [34].

Ao nível comercial, a técnica de hidrólise mais usada é a alcalina, onde diversas matérias-primas com colágeno, como peles, nervos e osseína de ossos, inclusive misturadas, podem ser processadas. No processo alcalino são geradas moléculas ligeiramente ramificadas, as quais apresentam massas molares entre 10.000 e 60.000 Da [27, 29, 30, 34].

### **3.1.2 Colágeno hidrolisado**

O colágeno hidrolisado é obtido através da hidrólise química e enzimática sob condições controladas [34]. Trata-se de uma proteína natural derivada do colágeno nativo, o qual é encontrado na pele e ossos de animais, como bovinos, suínos, aves e peixes [36]. O colágeno hidrolisado possui capacidade de dissolução em água ou salmoura, entretanto a grande maioria não apresenta capacidade de geleificação [30], também apresenta elevado conteúdo proteico (84 a 90 %) [37].

Durante o processo de obtenção do colágeno hidrolisado, as condições de processamento, matéria-prima e especificidade da enzima utilizada é o que determinarão a distribuição de massa molar, estrutura, composição e subseqüente características e propriedades funcionais do produto final [33].

### **3.1.3 Fibra de colágeno e fibra de colágeno em pó**

A fibra de colágeno é extraída das camadas internas do couro bovino através de um processo químico (tratamento alcalino com hidróxido de cálcio), passando por desengorduramento e secagem a baixas temperaturas (processo menos drástico) [38, 39]. A fibra de colágeno em pó é obtida por processo similar ao da fibra de colágeno, porém é submetida a temperaturas mais elevadas e posterior moagem. A fibra tem tamanho de partícula entre 1,80 a 1,92 mm e a fibra em pó entre 0,45 a 0,57 mm [33].

## **3.2 HIDRÓLISE ENZIMÁTICA**

A utilização de enzimas para modificar as proteínas é uma alternativa ao uso de reações químicas, transformações físicas e alterações genéticas. As reações hidrolíticas (ácida e alcalina) são inespecíficas e destroem aminoácidos como o triptofano, comprometendo o valor nutricional das proteínas, devido a isso os métodos enzimáticos vem ganhando destaque [40].

A hidrólise enzimática, utilizando enzimas específicas, possibilita o controle do grau de clivagem das proteínas no substrato. A relação enzima/substrato e tempo de reação são fundamentais para a produção de hidrolisados com diferentes características, dentre elas, estruturas moleculares e propriedades funcionais [41]. O tamanho do peptídeo obtido no processo de hidrólise enzimática influencia diretamente nas suas propriedades funcionais, sensoriais e nutricionais, sendo assim, o grau de hidrólise da amostra protéica é uma das características mais importantes a ser analisada [42].

O grau de hidrólise é a medida do grau de clivagem de ligações peptídicas, o qual pode variar de 0 até 100%, ou seja, as proteínas podem permanecer intactas ou serem completamente hidrolisadas, ocorrendo a liberação de aminoácidos livres. As condições de processo como: relação enzima/substrato, tempo, temperatura, pH e a natureza da enzima determinam o grau de hidrólise do substrato protéico [43].

A especificidade, o controle do grau de hidrólise, as condições moderadas de ação e o menor conteúdo de sal no hidrolisado final são algumas das vantagens da utilização de proteases específicas na hidrólise de colágenos. Não obstante, as enzimas podem ser usadas em menores quantidades e não necessitam de remoção ao final do processo [8]. Para aumentar as propriedades funcionais das proteínas através da modificação estrutural é feita a hidrólise enzimática, devido esta possuir a capacidade de modificar uma variedade de grupos funcionais [9, 10].

### **3.2.1 Proteases e collagenases**

As enzimas, catalisadores bioquímicos vitais para todos os seres vivos, aceleram as reações químicas entre compostos orgânicos nas células. As enzimas são exploradas, na área da ciência e tecnologia de alimentos, com o intuito de realizar funções desejáveis, facilitando a conversão de matérias-primas em alimentos de alta qualidade. As enzimas são utilizadas com grande frequência em processos biológicos, visando à obtenção de produtos de alta funcionalidade e alto valor nutritivo [44].

A combinação entre eficácia e economia são os parâmetros normalmente utilizados para a escolha da enzima utilizada no processo, além de sua habilidade em hidrolisar o substrato na extensão desejada [44].

Ao grupo das hidrolases pertencem as enzimas proteolíticas, proteases ou proteinases, estas envolvem a água na formação do produto. Durante a hidrólise de proteínas as proteinases catalisam a reação, provocando a ruptura das ligações peptídicas, liberando componentes do substrato para a água. A origem destas enzimas pode ser animal, vegetal ou microbiana [45].

As enzimas proteolíticas usadas em processos de hidrólise são classificadas como endo e exopeptidases. As endopeptidases possuem a capacidade de hidrolisar ligações peptídicas de forma aleatória nas moléculas de proteína, gerando peptídeos relativamente grandes. Já as exoproteases, removem de forma sistêmica os aminoácidos do N-terminal ou no C-terminal ou hidrolisam peptídeos nas ligações terminais [46].

A enzima Alcalase<sup>®</sup> foi desenvolvida pela empresa Novo Nordisk (Bagsvaerd, Denmark) e provém da fermentação submersa do micro-organismo *Bacillus licheniformis*, apresenta máxima atividade em pH 8,0 e temperatura de 50 °C [47]. É classificada como uma subtilisina, uma serina-protease, conhecida pelo seu desempenho sob altas temperaturas e moderada alcalinidade [48]. Esta enzima hidrolisa principalmente ligações peptídicas contidas de resíduos hidrofóbicos no lado carboxílico [49].

A enzima Flavourzyme<sup>®</sup> pode atuar sob condições neutras ou ligeiramente ácidas de hidrólise, se tratando de uma protease fúngica complexa, a qual é oriunda da fermentação submersa de uma linhagem específica de *Aspergillus oryzae* sem modificação genética [50]. Seu pH e temperatura de máxima atividade é de 7,0 e 50 °C, respectivamente [47]. A hidrólise utilizando a enzima Flavourzyme<sup>®</sup> provoca a liberação de aminoácidos N-terminal, sendo preferencialmente liberada a leucina, podendo ser liberados outros aminoácidos incluindo prolina [51].

A Flavourzyme<sup>®</sup> trata-se da mistura de proteases, endoproteinase e exopeptidase, ou seja, contém ambas as atividades. A aplicação de endoproteinases é dominante em alimentos proteicos hidrolisados. Entretanto, quando se deseja a completa degradação de proteínas as endoproteinases são combinadas com exopeptidases [52].

A pepsina é uma protease digestiva encontrada no suco gástrico de vertebrados [53]. Esta enzima, ao contrário de outras endopeptidases, hidrolisa apenas ligações peptídicas. Cliva preferencialmente resíduos hidrofóbicos, aromáticos. A hidrólise da ligação peptídica que possui um aminoácido aromático se torna mais suscetível quando um aminoácido contido de enxofre se encontra perto da ligação em questão [54].

A pepsina pode clivar também grupos carboxila de fenilalanina e leucina e em menor grau o grupo carboxila de resíduos de ácido glutâmico. A pepsina não cliva ligações valina, alanina, glicina [55]. A amidação do grupo carboxila C-terminal evita a hidrólise pela enzima pepsina [55, 56].

Dentre as enzimas descritas acima, a mais utilizada e citada em processos de hidrólise proteica é a Alcalase<sup>®</sup>, seguida a Flavourzyme<sup>®</sup>. A pepsina é mais utilizada em processos de extração de colágenos.

### 3.3 ULTRASSOM

As ondas sonoras, provocadas pelo uso do ultrassom, causam uma variação na pressão do líquido empregado no processo, gerando a cavitação. Durante a sonicação são formadas bolhas de cavitação, as quais sofrem violento colapso, levando a temperaturas e pressões

extremas, o que causa cisalhamento e turbulência na zona de cavitação. O tempo e frequência de aplicação do ultrassom devem ser controlados, pois o uso deste pode levar a formação de radicais livres decorrentes da hidrólise de moléculas de água, os quais podem reagir com outras moléculas [57].

A utilização do ultrassom na indústria de alimentos vem se destacando [57], pois este pode melhorar a eficiência de processo, reduzir o tempo e contribuir para uma produção mais limpa, além de possuir baixo consumo de energia elétrica e melhorar a difusão [58]. Também é uma técnica eficaz e segura, a qual pode melhorar a qualidade de alimentos. O ultrassom pode ser aplicado para alterar as propriedades químicas e físicas de alimentos [59], nas etapas de processamento, nos processos de preservação e extração e em combinação com outros processos [60].

O ultrassom é amplamente utilizado na transferência de massa em processos úmidos, os quais são de grande importância na mistura, extração e secagem [61, 62] e na extração de substâncias de baixo peso molecular e para compostos bioativos de vegetais [63].

Pesquisas recentes mostraram que o ultrassom pode modificar a estrutura e as propriedades funcionais das proteínas alimentares [11-14], principalmente aquelas de origem animal [15, 16]. Pode causar aumento na atividade enzimática pela melhor ligação substrato/enzima e exposição do sítio ativo da enzima. Quando utilizado como pré-tratamento e/ou concomitante ao processo de hidrólise, afeta as ligações de hidrogênio e interações hidrofóbicas, rompendo estruturas terciárias e quaternárias das proteínas devido aos efeitos de cavitação. Essas modificações estruturais possibilitam o acesso da enzima à estrutura, causando um aumento no grau de hidrólise e da bioatividade [17].

O ultrassom de alta intensidade (20 k Hz, 400 W) foi utilizado como pré-tratamento para proteína isolada de soja. A utilização do ultrassom melhorou a capacidade de retenção de água, força e firmeza dos géis da mesma, ou seja, o tempo de sonicação (0, 5, 20, e 40 minutos) apresentou efeito significativo sobre estas propriedades [57].

O ultrassom foi utilizado primeiramente na área bioquímica para quebrar a parede celular e liberar o conteúdo. Em outro momento, foi verificado o efeito positivo do ultrassom sobre a atividade enzimática, entretanto, a intensidade elevada de aplicação pode levar a desnaturação da enzima [60]. Os pesquisadores Yu *et al.* [60] avaliaram a influência do ultrassom na atividade da tirosinase. Estes verificaram o aumento da atividade da enzima, o que foi justificado pela melhor ligação substrato-enzima e exposição do sítio ativo da enzima.

A cinética enzimática e a atividade inibitória de ECA-I de peptídeos do gérmen de trigo obtidos por processo assistido de ultrassom foi estudada por Qu *et al.* [64], o quais

verificaram que o ultrassom aumentou a taxa de reação enzimática e atividade inibitória de ECA-I, o que foi justificado pela melhor transferência de massa, aumento da frequência de contato entre enzima e substrato e alteração da configuração da enzima.

Li *et al.* [65] extraíram colágeno de tendão bovino utilizando no processo ultrassom (40 kHz, 120 W). Através dos resultados obtidos foi possível verificar que o ultrassom aumentou em até 124% a extração e também reduziu o tempo de processo. Os autores justificaram este fato pelo aumento da atividade e dissolução do substrato, causados pela irradiação, a qual permitiu maior dispersão da pepsina (enzima utilizada no processo de extração) e abertura das fibrilas de colágeno, facilitando a ação da enzima.

### 3.4 ALIMENTOS FUNCIONAIS

Alimentos funcionais devem possuir pelo menos um componente de ação seletiva sobre uma ou várias funções do organismo, causando efeitos positivos, funcionais (fisiológicos) ou saudáveis [66-68]. Segundo Zhang *et al.* [69] para os alimentos serem considerados funcionais devem ser derivados de ingredientes naturais, serem consumidos como parte da dieta diária e envolver a regulação de processos específicos como prevenção de doenças, melhorar a resposta imunológica e evitar o envelhecimento.

Os produtos com teor reduzido de sódio, gordura e colesterol, com melhor composição do perfil de ácidos graxos, menor teor de nitrito e inclusão de ingredientes funcionais são alguns exemplos de alimentos considerados funcionais [6, 69].

Devido à demanda por produtos funcionais, alguns estudos têm avaliado o enriquecimento da carne *in natura* com compostos bioativos como o ácido linoléico conjugado, carnosina, anserina, L-carnitina, glutathione, taurina e creatina [70]. Há pesquisas também com peptídeos bioativos obtidos de carnes e produtos cárneos [71-73] que podem ser incorporados em outros tipos de produtos para melhorar as propriedades funcionais desses alimentos. Estes peptídeos podem ser gerados durante o processo de fermentação ou serem obtidos através de hidrólise enzimática, apresentando benefícios à saúde humana.

Em alguns estudos peptídeos hidrolisados de subprodutos e músculos foram isolados, identificados, caracterizados e a atividade antioxidante, antimicrobiana e inibidora da atividade da ECA-I foram comprovados *in vitro* [7, 74].

Com relação aos peptídeos obtidos do colágeno, estudos demonstram excelente absorção dos peptídeos que contém o aminoácido hidroxiprolina. Kim & Mendis [75] mencionaram que a sequência de aminoácidos Gly-Pro-Hyp presente no colágeno apresenta propriedades antioxidantes e anti-hipertensivas.

Segundo Broncano *et al.* [73] são necessários mais estudos para isolamento e purificação dos peptídeos, pois a maioria dos estudos tem enfoque na questão sensorial e poucos na bioatividade.

### **3.4.1 Peptídeos bioativos**

Os peptídeos encontrados em hidrolisados proteicos, obtidos por hidrólise enzimática, têm apresentado diversas propriedades físico-químicas e atividades biológicas, as quais dependem de sua sequência de aminoácidos e massa molecular. A massa molecular dos peptídeos é essencial para sua atividade biológica e também para sua separação [76].

Os peptídeos bioativos presentes no interior da molécula de proteína são definidos como uma sequência de aminoácidos inativos, entretanto, quando são liberados através da hidrólise química e/ou enzimática exercem determinadas atividades biológicas. Durante o processo de industrialização ou na digestão gastrointestinal são liberados peptídeos com 3 a 20 aminoácidos [1, 7].

A partir de uma determinada proteína podem ser gerados vários tipos de peptídeos, estes dependem de dois fatores: a especificidade da enzima e a sequência primária da proteína do substrato utilizado [77].

A partir de meados do ano 2000 começaram a surgir pesquisas para obtenção, fracionamento e caracterização de hidrolisados e peptídeos de colágeno [1] objetivando avaliar as propriedades funcionais destes compostos. Os peptídeos derivados de colágeno podem ser obtidos através da hidrólise enzimática utilizando proteases animais, vegetais ou microbianas, tais como tripsina, quimotripsina, pepsina, alcalase, collagenases, bromelina e papaína [4-6], aplicadas aos subprodutos do abate de bovinos permitindo agregar valor [4, 7]. Também podem ser formados naturalmente pelo processo de fermentação de produtos cárneos devido às reações proteolíticas [6, 73]. Os peptídeos de colágeno podem apresentar atividade antimicrobiana, antioxidante e anti-hipertensiva [78-80].

Os peptídeos bioativos devem resistir à passagem gastrointestinal [1], atravessando o epitélio intestinal e chegar aos tecidos periféricos via circulação sistêmica, influenciando o metabolismo celular e atuando como vaso reguladores, fatores de crescimento, indutores hormonais e neurotransmissores [7, 81].

Os compostos bioativos, dentre eles os peptídeos, podem prevenir doenças, promover a saúde [1, 81], evitar o envelhecimento precoce e o estresse oxidativo [70].

### 3.4.2. Atividade antioxidante

Antioxidantes são compostos utilizados em pequenas quantidades que previnem ou retardam reações de oxidação, devido a sua capacidade de sequestrar ou evitar a formação de radicais livres [82].

O antioxidante deve ser eficiente em baixas concentrações, não provocar efeitos indesejáveis na cor, sabor e odor, ser de fácil aplicação, possuir estabilidade em condições de processamento e armazenamento, não pode ser tóxico, assim como seus produtos de oxidação, deve ser de custo baixo ou razoável e atender ao consumidor [83]. Os antioxidantes são definidos como um grupo de substâncias formado por vitaminas, minerais, pigmentos naturais e outros compostos vegetais, também por enzimas, as quais impedem o efeito negativo dos radicais livres [84].

Existe uma grande variedade de compostos antioxidantes, naturais ou sintéticos, podendo ser utilizados em alimentos, fármacos ou como suplementos nutricionais, desde que sejam seguros para a saúde humana. Os antioxidantes sintéticos possuem estrutura fenólica, apresentando diversos graus de substituição alquil [85], destacando-se: hidroxianisol de butila (BHA) e o hidroxitolueno de butila (BHT) [86, 87]. Os compostos naturais podem ser fenólicos (tocoferóis, flavonóides, e ácidos fenólicos), nitrogenados (alcalóides, derivados da clorofila, aminoácidos e amins), ou carotenóides, bem como ácido ascórbico [85].

A atividade antioxidante dos peptídeos bioativos se deve a capacidade destes em quelar metais como o cobre [70]. O efeito protetor dos hidrolisados protéicos e dos peptídeos do soro do leite está relacionado à alta concentração de aminoácidos sulfurados presentes nos mesmos, estes, são considerados essenciais na síntese da glutathione [88]. A glutathione é o principal antioxidante produzido pela célula [89], interferindo na catálise, metabolismo e transporte celular. Está envolvida na síntese de proteínas e ácidos nucléicos, em reações de metabolização de peróxido e na inativação de radicais livres [90].

No estudo realizado por Li *et al.* [78], hidrolisados de colágeno suíno, obtidos através de hidrólise enzimática (protease de pâncreas bovino, protease de *Streptomyces* e proteases de *Bacillus spp.*), apresentaram atividade antioxidante, especialmente as sequências: Gln-Gly-Ala-Arg, Hyp-Cys, Leu-Gln-Gly-Met e Leu-Gln-Gly-Met-Hyp. Já Kim *et al.* [80] encontrou atividade antioxidante da sequência de aminoácidos Gly-Pro-Hyp-Gly-Pro-Hyp-Gly-Pro-Hyp-Cys, obtida através da hidrólise enzimática de couro bovino.

Entre os vários métodos “*in vitro*” utilizados para analisar a atividade antioxidante de substâncias biologicamente ativas destacam-se: o método de sequestro do radical 2,2-difenil-1-picril-hidrazil (DPPH) [91], método de sequestro do radical hidroxila (OH•) [92], o método

de sequestro do radical 2,2-azinobis (3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfônico) (ABTS+) [93], inibição da peroxidação lipídica [94] e poder redutor [95].

### 3.4.3 Atividade antimicrobiana

A atividade antimicrobiana dos peptídeos se deve a capacidade destes em se ligar com a membrana celular bacteriana, inibindo o crescimento de micro-organismos. Esta atividade é provocada pela presença de aminoácidos hidrofóbicos. Estudos relatam atividade antimicrobiana de peptídeos oriundos da hemoglobina bovina e da carne [7], entretanto, as proteínas encontradas em ovos, peixes, diversas fontes vegetais (soja, trigo, entre outras) também apresentam esta atividade biológica [96].

Os peptídeos com potencial antimicrobiano são pequenos, possuem carga positiva e molécula anfipática (possuem regiões hidrofóbicas e hidrofílicas), sua composição e comprimento variam de 6 a 100 resíduos de aminoácidos [97]. O mecanismo molecular e a via de permeação da membrana pelo peptídeo variam de acordo com a sua sequência de aminoácidos, composição da membrana lipídica e a sua concentração [98].

Recentemente várias pesquisas vêm estudando diferentes fontes de obtenção de peptídeos antimicrobianos [99-101]. Os peptídeos com atividade antimicrobiana podem apresentar ação contra bactérias Gram-positivas e Gram-negativas, como: *Escherichia*, *Helicobacter*, *Listeria*, *Salmonella* e *Staphylococcus* [102].

O gênero *Salmonella* pertence à família *Enterobacteriaceae*, compreendendo bacilos Gram-negativos não produtores de esporos. As bactérias pertencentes a este gênero são anaeróbias facultativas, podendo produzir gás a partir de glicose e utilizar o citrato como sua única fonte de carbono. Seu pH ótimo de atividade fica em torno da neutralidade, onde valores superiores a 9,0 e inferiores a 4,0 são bactericidas e a temperatura ideal varia de 35 a 37 °C, sendo limites de multiplicação a mínima de 5 °C e a máxima de 47 °C. São encontradas no trato gastrointestinal do homem e de animais, principalmente aves e suínos [103].

O gênero *Staphylococcus* trata-se de cocos Gram-positivos, os quais pertencem à família *Micrococcaceae* por dividirem-se em planos diferentes. São bactérias anaeróbias facultativas, entretanto sua melhor multiplicação ocorre sob condições aeróbias. Tratam-se de bactérias mesófilas, apresentando temperatura de crescimento entre 7 e 47,8 °C. A produção ótima de enterotoxinas se dá entre temperaturas de 40 e 45 °C, porém também podem ocorrer entre as temperaturas de 10 e 46 °C [103].

No estudo realizado por Soares [104] utilizando hidrolisado protéico de torta de soja obtido em pH 7,0 com uso da papaína, frente à bactéria gram-positiva *Staphylococcus aureus*,

uma concentração de hidrolisado igual a 3,753 mg/mL foi capaz de inibir o crescimento bacteriano. Já Hayes *et al.* [105] não detectaram zona de inibição pelos peptídeos IKHQGLPQE  $\alpha_{s1}$ -CN f(21-29), VLNENLLR  $\alpha_{s1}$ -CN f(30-38) e SDIPNPI G SENSEK  $\alpha_{s1}$ -CN f(195-208), os quais foram sintetizados a partir da fermentação de *L. Acidophilus* DPC6026 em caseinato de sódio, contra a bactéria *Staphylococcus aureus*.

Seo *et al.* [100] também verificaram atividade antimicrobiana de um peptídeo purificado a partir do extrato de pele de atum (*Katsuwonus pelamis*), apresentando 3,4 kDa. Este apresentou atividade antimicrobiana contra bactérias Gram-positivas *Bacillus subtilis*, *Micrococcus luteus*, *Staphylococcus aureus*, e *Streptococcus iniae*, com concentrações de amostra entre 1,2 e 17,0  $\mu\text{g/mL}$  e contra as bactérias Gram-negativas *Aeromonas hydrophila*, *Escherichia coli* D31 e *Vibrio parahaemolyticus* (concentração de amostra variando de entre 3,1 e 12,0  $\mu\text{g/mL}$ ) e contra *Cândida albicans* (concentração de amostra de 16,0  $\mu\text{g/mL}$ ).

### 3.5 TÉCNICAS DE CARACTERIZAÇÃO ESTRUTURAL DE PROTEÍNAS

#### 3.5.1 Espectroscopia na região do infravermelho com transformada de Fourier (FTIR)

A aplicação de espectroscopia na região do infravermelho com transformada de Fourier (FTIR) é crescente em pesquisas que envolvem alimentos [106].

A FTIR é uma técnica que permite a análise qualitativa de compostos orgânicos, visto que os modos característicos de vibração de cada grupo geram o aparecimento de bandas no espectro infravermelho em frequências específicas, também são influenciadas pela presença de grupos funcionais próximos (acoplamentos) [107, 108]. Um espectro de infravermelho normalmente contém informação além das de valores de posição ou de absorção de alguns picos, ou seja, quando utilizado integralmente, pode atuar como a impressão digital de uma amostra específica. A espectroscopia FTIR atua excelentemente como ferramenta de análise quantitativa, isso se deve ao equilíbrio entre a concentração e as intensidades de absorção das bandas no espectro [109].

A espectroscopia na região do infravermelho com transformada de Fourier (FTIR) é uma técnica de impressão digital bioquímica muito rápida [110], também é simples de usar, possui alta sensibilidade e baixo custo operacional [111].

No estudo realizado por Duan *et al.* [112] a análise de espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier foi utilizada para verificação da predição

conformacional da estrutura secundária do peptídeo purificado de transferrina do ovo. Os resultados sugeriram que a conformação do peptídeo era baseada em  $\beta$ -folhas.

Li *et al.* [113] estudaram a influência do peso molecular médio nas propriedades antioxidantes e funcionais de hidrolisados de colágeno da cartilagem de *Sphyrna lewini*, *Dasyatis akjei* e *Raja porosa*. As posições das bandas de FTIR para os colágenos hidrolisados foram quase inalteradas após a hidrólise. Os autores justificaram este fato pela parcial ruptura das estruturas secundárias dos hidrolisados de colágeno, provocada pela digestão de tripsina. Entretanto, foi verificado que os hidrolisados apresentaram absorbâncias integrais (a área das bandas) menores comparados as suas proteínas de origem, sugerindo que o colágeno foi hidrolisado em polipeptídios.

### 3.5.2 Análise Multivariada: Análise de Componentes Principais (PCA)

A análise de componentes principais (PCA) é um método que possibilita a interpretação multivariada de conjuntos de dados complexos por meio de gráficos bi- ou tridimensionais [114], utilizando suas respectivas matrizes de variâncias-covariâncias ou de correlações entre os parâmetros considerados. Trata-se de uma transformação linear de todas as variáveis originais em novas variáveis, onde a primeira nova variável computada é responsável pela maior parte da variabilidade no conjunto de dados, a segunda pela maior oscilação possível restante, e assim continuamente até a explicação de toda a variação do conjunto [114-116].

Existem métodos supervisionados e não supervisionados. Nos métodos supervisionados existe alguma informação inicial, contemplando a identidade das amostras para a formação das classes. O objetivo deste método é desenvolver um modelo baseado nas informações contidas nas amostras. Já nos métodos não supervisionados ocorre a separação sem a necessidade de informações iniciais sobre a natureza das amostras, sendo o objetivo identificar agrupamentos naturais entre elas [117].

A PCA é utilizada para visualizar a estrutura dos dados, encontrar similaridades entre amostras, detectar amostras anômalas (*outliers*) e reduzir a dimensionalidade através da representação do conjunto de dados em um novo sistema de eixos, denominados componentes principais (PC), permitindo a visualização da natureza multivariada dos dados em poucas dimensões. No espaço original, as amostras são pontos localizados em um espaço  $n$ -dimensional, sendo  $n$  igual ao número de variáveis. A PCA proporciona a redução da dimensionalidade, onde as amostras passam a ser pontos localizados em espaços de dimensões reduzidas definidos pelas PCs (bi- ou tridimensionais) [108].

A modelagem dos dados utilizando a PCA proporciona a visualização dos principais componentes em mais de duas dimensões, além de ser um método robusto, possível de analisar dados não normais, possuindo alto desempenho [118].

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] E.A. Decker & Y. Park, Healthier meat products as functional foods, *Meat Science*, 86 (2010) 49-55.
- [2] Z.Y. Liu, A.C.M. Oliveira & Y.C. Su, Characterization of pepsin-solubilized collagen from skin and connective tissue of giant red sea cucumber (*Parastichopus californicus*), *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 58 (2010) 1270–1274.
- [3] F. Pati, B. Adhikari & S. Dhara, Isolation and characterization of fish scale collagen of higher thermal stability, *Bioresource Technology*, 101 (2010) 3737-3742.
- [4] J.D. Webster, D.A. Ledward & R.A. Lawrie, Protein hydrolysates from meat industry by-products, *Meat Science*, 7 (1982) 147-157.
- [5] M.C. Gómez-Guillén, B. Giménez, M.E. López-Caballero & M.P. Montero, Functional and bioactive properties of collagen and gelatin from alternative sources: A review, *Food Hydrocolloids*, 25 (2011) 1813-1827.
- [6] M.I. Khan, M.S. Arshad, F.M. Anjum, A. Sameen, A. Rehman & W. Gill, Meat as a functional food with special reference to probiotic sausages, *Food Research International*, 44 (2011) 3125-3133.
- [7] R.D. Bernardini, P. Harnedy, D. Bolton, J. Kerry, E. O'Neill, A.M. Mullen & M. Hayes, Antioxidant and antimicrobial peptidic hydrolysates from muscle protein sources and by-products, *Food Chemistry*, 134 (2011) 1296-1307.
- [8] E.R. Zavareze, C. M. Silva, M. Salas-Mellado & C. Prentice-Hernández, Funcionalidade de hidrolisados proteicos de cabrinha (*Prionotus punctatus*) obtidos a partir de diferentes proteases microbianas, *Química Nova*, 32(7) (2009) 1739-1743.
- [9] N. Bhaskar, V. K. Modi, K. Govindaraju, C. Radha & R.G. Lalitha, Utilization of meat industry by products: protein hydrolysate from sheep visceral mass, *Bioresource technology* 98 (2) (2007) 388-394.
- [10] V.D.M. Silva & M.P.C. Silvestre, Functional properties of bovine plasma intended for use as a functional ingredient in human food, *Food Science and Technology*, 37(6) (2003) 709-18.
- [11] M. Ashokkumar, Applications of ultrasound in food and bioprocessing, *Ultrasonics Sonochemistry*, 25 (2015) 17–23.
- [12] A.C. Soria, & M. Villamiel, Effect of ultrasound on the technological properties and bioactivity of food: a review, *Trends in Food Science & Technology*, 21(7) (2010) 323–331.
- [13] J. Chandrapala, B. Zisu, M. Palmer, S. Kentish & M. Ashokkumar, Effects of ultrasound on the thermal and structural characteristics of proteins in reconstituted whey protein concentrate, *Ultrasonics Sonochemistry*, 18(5) (2011) 951–957.

- [14] C. Arzeni, K. Martínez, P. Zema, A. Arias, O.E. Pérez & A.M.R. Pilosof, Comparative study of high intensity ultrasound effects on food proteins functionality, *Journal of Food Engineering*, 108(3) (2012a) 463–472.
- [15] A.R. Jambrak, T.J. Mason, V. Lelas & G. Krešić, Ultrasonic effect on physicochemical and functional properties of  $\alpha$ -lactalbumin LWT, *Food Science and Technology*, 43 (2) (2010) 254–262.
- [16] J. O'Sullivan, B. Murray, C. Flynn & I. Norton, The effect of ultrasound treatment on the structural, physical and emulsifying properties of animal and vegetable proteins, *Food Hydrocolloids*, 53 (2015) 141-154.
- [17] C. Ozuna, I.P. Martínez, E. C. Tostado, L. Ozimek & S. L. Amaya-Llano, Innovative applications of high-intensity ultrasound in the development of functional food ingredients: Production of protein hydrolysates and bioactive peptides, *Food Research International*, 77 (2015) 685–696.
- [18] M. Shimokomaki, Aproveitamento de subprodutos nas indústrias de carnes para produção de colágeno e suas aplicações, *Revista Nacional da Carne*, 16 (1992) 32–34.
- [19] B. Brodsky & V. Persikov, Molecular structure of the collagen triple helix, *Advances in Protein Chemistry*, 70 (2005) 301-339.
- [20] J.H. Muyong, C.G.B. Cole & K.G. Duodu, Characterization of acid soluble collagen from skins of young and adult Nile perch (*Lates niloticus*), *Food Chemistry*, 85(2004) 81–89.
- [21] P.J. Torley, B.R. D'Arcy & G.R. Trout, The effect of ionic strength, polyphosphates type, pH, cooking temperature and preblending on the functional properties of normal and pale, soft, exudative (PSE) pork, *Meat Science*, 55 (2000) 451-462.
- [22] K. Gelse, E. Pöschl & T. Aigner, Collagens-structure, function, and biosynthesis, *Advanced Drug Delivery Reviews*, 55 (2003) 1531–1546.
- [23] L.S. Senarantne, P.J. Park & S.K. Kim, Isolation and characterization of collagen from brown backed toadfish (*Lagocephalus gloveri*) skin, *Bioresource Technology*, 97 (2006) 191-197.
- [24] S. Sinthusamran, S. Benjakul & H. Kishimura, Characteristics and gel properties of gelatin from skin of sea bass (*Lates calcarifer*) as influenced by extraction conditions, *Food Chemistry*, 152 (2014) 276–284.
- [25] E.A. Foegeding & J.P. Davis, Food protein functionality: A comprehensive approach, *Food Hydrocolloids*, 25(8) (2011) 1853–1864.
- [26] M.R. Bet, G. Goisis & C.A. Lacerda, Characterization of Polyanionic collagen prepared by selective hydrolysis of asparagine and glutamine carboxamide side chains, *Biomacromolecules*, 2 (2001) 1074-1079.
- [27] H.W. Ockerman & C.L. Hansen, *Industrialización de subproductos de origen animal*, Zaragoza: Acribia, (1994) 133–160p.

- [28] S. Barbut & G.S. Mittal, Effect of heat processing delay on the stability of poultry meat emulsions containing 1,5 and 2,5 % salt, *Poultry Science*, 70 (1991) 2538-2543.
- [29] J.M. Deman, *Principles of food Chemistry*, Aspen: Maryland, (1999) 147-149p.
- [30] S. Damodaran, K. Parkin & O.R. Fennema, *Química de Alimentos de Fennema*, Artmed, (2010) 900p.
- [31] J. Poppe, *Gelatin: In Thickening and gelling agents for food*. London: Blackie Academic and Professional, (1992).
- [32] E.V.D. Bosch & C. Gielens, Gelatin degradation at elevated temperature. *Biological Macromolecules*, 32 (2003) 129-138.
- [33] R.C. Prestes, Efeitos da adição de colágeno na qualidade de presunto de Frango, Tese de Doutorado, Pós-Graduação em Engenharia de Alimentos da Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e das Missões (URI), 2011.
- [34] R. Schrieber & H. Gareis, *Gelatine Handbook: Theory and Industry Practice*, Hardcover, (2007) 371p.
- [35] D.W.S. Wong, *Química de los alimentos: mecanismos y teoría*, Zaragoza: Zaragoza, (1995) 109-116p.
- [36] A. Denis, N. Brambati, B. Dessauvages, S. Guedji, C. Ridoux, N. Meffre & C. Autier, Molecular weight determination of hydrolyzed collagens, *Food Hydrocolloids*, 22 (2008) 989-994.
- [37] G. Francischetti, C.B. Ortelan, C.J.C. Contreras-Castilho, C.R. Gallo, A. Cavenaghi, L.C. Montenegro & D.E. Puga, Caracterização e vida-útil do músculo *biceps femoris* (coxão duro) submetidos à marinação com pó de colágeno, fibra de trigo e proteína isolada de soja, IV Congresso Brasileiro de Ciência e Tecnologia de Carnes, Anais, Campinas, (2007) 378 – 380.
- [38] R.C. Santana, A.C.K. Sato & R.S. Cunha, Emulsions stabilized by heat-treated collagen fibers, *Food Hydrocolloids*, 26 (2012) 73-81.
- [39] G.J. Maximo & R.L. Cunha, Mechanical properties of collagen fiber and powder gels, *Journal of Textures Studies*, 41 (2010) 842–862.
- [40] V.C. Sgarbieri, *Proteínas em alimentos proteicos: Propriedades, Degradações e Modificações*, 1ª ed. São Paulo: Livraria Varela, (1996) 520 p.
- [41] A.C. Onodonalore & F. Shahidi, Protein dispersions and hydrolysates from shark (*Isurus oxyrinchus*), *Journal of Aquatic Food Product Technology*, 5(4) (1996) 43-59.
- [42] Y. Thiansilakul, S. Benjakul & F. Shahidi, Compositions, functional properties and antioxidative activity of protein hydrolysates prepared from round scad (*Decapterus maruadsi*), *Food Chemistry*, 103 (2007) 1385–1394.

- [43] D. Panyam & A. Kilara, Enchanting the functionality of food proteins by enzymatic modification, *Trends in Food Science and Technology*, 7(4) (1996) 120-125.
- [44] W.J. Lahl & S.D. Braun, Enzymatic production of protein hydrolysates for food use, *Food Technology*, 58 (1994) 68 - 71.
- [45] R. Whitaker, *Principles of Enzymology for Food Science*, Marcel Decker, New York, 1994.
- [46] A. Clemente, Enzymatic protein hydrolysates in human nutrition, *Trends in Science & Technology*, 11 (200) 254-262.
- [47] W. Jung, R. Karawita, S. Heo, B. Lee, S. Kima & Y. Jeon, Recovery of a novel ca-binding peptide from Alaska Pollack (*Theragra chalcogramma*) backbone by pepsinolytic hydrolysis, *Process Biochemistry*, 41 (2006) 2097–2100.
- [48] C. G. Schmidt, Hidrólise enzimática das proteínas de carne de frango, Dissertação de Mestrado, Pós-Graduação em Engenharia e Ciência de Alimentos, Fundação Universidade Federal do Rio Grande, 2008, 143p.
- [49] J. Adler-Nissen, *A Review of Food Protein Hydrolysis Specific Areas: Enzymic Hydrolysis of Food Proteins*, Elsevier Applied Science Publications, New York, (1986) 427 p.
- [50] R. Slizyte, E. Dauksas, E. Falch, I. Storrø, & T. Rustad, Yield and composition of different fractions obtained after enzymatic hydrolysis of cod (*Gadus morhua*) byproducts, *Process Biochemistry*, 40 (2005) 1415-1424.
- [51] M. Hammershøj, C. Nebel & J.H. Carstens, Enzymatic hydrolysis of ovomucin and effect on foaming properties, *Food Research International*, 41 (2008) 522-531.
- [52] S. Nilsang, S. Lertsiri, M. Suphantharika & A. Assavaning, Optimization of enzymatic hydrolysis of fish soluble concentrate by commercial proteases, *Journal of Food Engineering*, 70 (2005) 571–578.
- [53] P. Sepulveda, J.Jr. Marcinişzyn & D. Liu, J. Tang, Primary Structure of Porcine Pepsin. III. Amino Acid Sequence of a Cyanogen Bromide Fragment, CB2A, and the Complete Structure of Porcine Pepsin, *Journal of Biological Chemistry*, 250 (1975) 5082.
- [54] Sigma-Aldrich, Pepsin, Acesso em 25 de julho de 2016, Disponível em: <http://www.sigmaaldrich.com/lifescience/metabolomics/enzymeexplorer/analyticalenzymes/pepsin.html>
- [55] P.J. Sweeney & J.M. Walker, Proteolytic Enzymes for Peptide Production, *Enzymes of Molecular Biology, Methods in Molecular Biology™*, Humana Press, 16 (1993) 277-303.
- [56] M. Dixon, E.C. Webb, C.J.R. Thorne & K.F. Tipton, *Enzymes*. 3<sup>rd</sup> Edition, Longmans, Green & Co., London, and Academic Press, New York, (1979).

- [57] H. Hu, X. Fan, Z. Zhou, X. Xu, G. Dan, L. Wang, X. Huang, S. Pan & L. Zhu, Acid-induced gelation behavior of soybean protein isolate with high intensity ultrasonic pre-treatments, *Ultrasonic Sonochemistry*, 20 (2013) 187-195.
- [58] V. Sivakumar, G. Swaminathan, P.G. Rao, C. Muralidharan, A.B. Mandal & T. Ramasami, Use of ultrasound in leather processing Industry: Effect of sonication on substrate and substances – New insights, *Ultrasonics Sonochemistry*, 17 (2010) 1054-1059.
- [59] F. Chemat & M.K. Khan, Applications of ultrasound in food technology: processing, preservation and extraction, *Ultrasonic Sonochemistry*, 18 (2011) 813–835.
- [60] Z. Yu, W. Zeng & X. Lu, Influence of ultrasound to the activity of tyrosinase, *Ultrasonic Sonochemistry*, 20 (2013) 805-809.
- [61] V. Sivakumar & P.G. Rao, Studies on the use of Power ultrasound in leather dyeing, *Ultrasonic Sonochemistry*, 10 (2003) 85-94.
- [62] T.J. Mason, L. Paniwnyk, J.P. Lorimer, The uses of ultrasonic in food technology. *Ultrasonic Sonochemistry*, 3 (1996) 253-360.
- [63] C. Macías-Sánchez, M.R. E. Mantell, M. De La Ossa, L.M. Lubián & B.O. Montero, Comparison of supercritical fluid and ultrasound-assisted extraction of carotenoids and chlorophyll a from *Dunaliella salina*, *Talanta*, Espanha, 77 (2009) 948-952.
- [64] W. Qu, H. Ma, J. Jia, R. He, L. Luo & Z. Pan, Enzymolysis kinetics and activities of ACE inhibitory peptides from wheat germ protein prepared with SFP ultrasound-assisted processing, *Ultrasonic Sonochemistry*, 19 (2012) 1021-1026.
- [65] D. Li, C. Mu, S. Cai & W. Lin, Ultrasonica irradiation in the enzymatic extraction of collagen, *Ultrasonic Sonochemistry*, 16 (2009) 605-609.
- [66] M.B. Roberfroid, An European consensus of scientific concepts of functional foods, *Nutrition*, 16 (2000) 689-691.
- [67] L. Day, R. Seymour, K. Pitts, I. Komczak & L. Lundin, Incorporation of functional ingredients in foods, *Trends in Food Science & Technology*, 20 (2009) 338-395.
- [68] I. Siró, E. Kápolna, B. Kápolna & A. Lugasi, Functional food, Product development, marketing and consumer acceptance – A review, *Appetite*, 51 (2008) 456-467.
- [69] W. Zhang, S. Xiao, H. Samaraweera, E. J. Lee & D. U. Ahn, Improving functional value of meat products, *Meat Science*, 86 (2010) 15–31.
- [70] K. Arihara, Strategies for designing novel functional meat products, *Meat Science*, 74 (2006) 219-229.
- [71] Y. Nakamura, N. Yamamoto, K. Sakai & T. Takano, Antihypertensive effect of sour milk and peptides isolated from it that are inhibitors to angiotensin I-converting enzyme, *Journal of Dairy Science*, 78 (1995) 1253-1257.

- [72] L. Seppo, T. Jauhiainen, T. Poussa & R. Korpela, A fermented milk high in bioactive peptides has a blood-pressure lowering effect in hypertensive subjects, *American Journal of Clinical Nutrition*, 77 (2003) 326-330.
- [73] J.M. Broncano, J. Otte, M.J. Petró, V. Parra & M.L. Timón, Isolation and identification of low molecular weight antioxidant compounds from fermented “chorizo” sausages, *Meat Science*, 90 (2012) 494-501.
- [74] R.D. Bernardini, A.M. Mullen, D. Bolton, J. Kerry, E. O’neill & M. Hayes, Assessment of the angiotensin-I-converting enzyme (ACE-I) inhibitory and antioxidant activities of hydrolysates of bovine brisket sarcoplasmic proteins produced by papain and characterization of associated bioactive peptidic fractions, *Meat Science*, 90 (2012) 226-235.
- [75] S.E. Kim & E. Mendis, Bioactive compounds from marine processing byproducts – a review, *Food Research International*, 39 (2006) 383-393.
- [76] B.H. Sarmadi & A. Ismail, Antioxidative peptides from food proteins: A review, *Peptides*, 31(10) (2010) 1949-1956.
- [77] P.A. Harnedy, R.J. Fitzgerald, Bioactive peptides from marine processing waste and shellfish: A review, *Journal of Functional Foods*, 4 (2012) 6–24.
- [78] B. Li, F. Chen, X. Xang, B. Ji & Y. Wu, Isolation and identification of antioxidative peptides from porcine collagen hydrolysate by consecutive chromatography and electrospray ionization-mass spectrometry, *Food Chemistry*, 102 (2007) 1135-1143.
- [79] S.K. Kim, H.G. Byun, P.J. Park & F. Shahidi, Angiotensin I-converting enzyme inhibitory peptides purified from bovine skin gelatin hydrolysate, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49 (2001) 2992-2997.
- [80] G. Herregods, J. Camp, M. Morel, B. Ghesquiere, K. Gevaert, L. Verduyck, et al. Angiotensin I-converting enzyme inhibitory activity of gelatin hydrolysates and identification of bioactive peptides, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 59 (2011) 552-558.
- [81] J.M. Cánovas, P.Z. Rentero, A.M. Martínez, M.L. Hernández & J.A. Alemán, Peptídeos bioactivos, *Clínica e Investigación em Arteriosclerosis*, 23 (2011) 219-227.
- [82] J. Pokorny, Natural antioxidants for food use, *Trends in Food Science and Technology*, 2(9) (1991) 223-227.
- [83] V.C. Ramalho & N. Jorge, Antioxidantes utilizados em óleos, gorduras e alimentos gordurosos, *Química Nova*, 29(4) (2006) 755-760.
- [84] M.L.P. Bianchi & L.M.G. Antunes, Radicais livres e os principais antioxidantes da dieta, *Revista de Nutrição*, 12(2) (1999) 123-130.
- [85] C. Kaur & H.C. Kapoor, Antioxidants in fruits and vegetables - the millennium’s health, *International Journal of Food Science and Technology*, 36(7) (2001) 703-725.

- [86] J.M. Duarte-Almeida, R.J. Santos, M.I. Genovese & F.M. Lajolo, Avaliação da atividade antioxidante utilizando sistema  $\beta$ -caroteno/ácido linoléico e método de seqüestro de radicais DPPH•, *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, 26(2) (2006) 446-452.
- [87] J. Je, K. Lee, M.H. Lee & C. Ahn, Antioxidant and antihypertensive protein hydrolysates produced from tuna liver by enzymatic hydrolysis, *Food Research International*, 42 (2009) 1266–1272.
- [88] M.T.B. Pacheco, J. Amaya-Farfan & V.C. Sgarbieri, Partial characterization of a whey protein concentrate and its enzyme hydrolysates, *Journal of Food Biochemistry*, 26 (2002) 327-33802.
- [89] B. Lomaestro & M. Malone, Glutathione in health and disease: Pharmacotherapeutic Issues, *Annals of Pharmacotherapy*, 29(12) (1995) 1263-1273.
- [90] A.S.S.R. Neto, Glutathione em defesa antioxidante, regulação de morte celular programada e destoxificação de drogas. Dissertação de Mestrado, Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade Fernando Pessoa, Faculdade Ciências da Saúde, Porto, 2010, 77p.
- [91] M.S.M. Rufino, R.E. Alves, E.S. Brito, S.M. Morais, C.G. Sampaio, J. Pérezjiménez & F. D. Saura-Calixto, Determinação da atividade antioxidante total em frutas pela captura do radical livre ABTS•+, Embrapa Agroindústria Tropical, Comunicado Técnico 128, 1ª edição *online*: julho de 2007.
- [92] A.D. Sarma & R. Sharma, Anthocyanin-DNA copigmentation complex: mutual protection against oxidative damage, *Phytochemistry*, 52 (1999) 1313-1318.
- [93] R. Re, N. Pellegrini, A. Proteggente, A. Panala, M. Yang & C. Rice-Evans, Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radicals in Chemistry, Biology and Medicine*, 26 (1999) 1231-1237.
- [94] R.J. Nascimento, C.R. Araújo & E.A. Melo, Atividade antioxidante de extratos de resíduo agroindustrial de goiaba (*Psidium guajava* L.), *Alimentos e Nutrição*, 21(2) (2010) 209-216.
- [95] T. Sun, S.A. Tanumihardjo, An integrated approach to evaluate food antioxidant capacity, *Journal of Food Science*, 72(9) 2007) 159-65.
- [96] D. Agyei, V. Apostolopoulos & M. Danquah, Rethinking Food-derived Bioactive Peptides for Antimicrobial and Immunomodulatory activities, *Trends in Food Science & Technology*, Elsevier, 2011.
- [97] A. Giuliani, G. Pirri & S. Nicoletto, Antimicrobial peptides: An overview of a promising class of therapeutics, *Central European Journal of Biology*, 2(2007) 1–33.
- [98] M. Zasloff, Antimicrobial peptides of multicellular organisms, *Nature*, 415 (2002) 389–395.

- [99] X. Yang, Y. Hu, S. Xu, Y. Hu, H. Meng, C. Guo, Y. Liu, J. Liu, Z. Yu & H. Wang, Identification of multiple antimicrobial peptides from the skin of fine-spined frog, *Hylarana spinulosa* (Ranidae), *Biochimie*, 95 (2013) 2429-2436.
- [100] J. Seo, M.J. Lee, H. Go, Y.J. Kim & N.G. Park, Antimicrobial function of the GAPDH-related antimicrobial peptide in the skin of skipjack tuna, *Katsuwonus pelamis*, *Fish & Shellfish Immunology*, 36 (2014) 571-581.
- [101] C.-H. Ting, H.-N. Huang, T.-C. Huang, C.-J. Wu & J.-Y. Chen, The mechanisms by which pardaxin, a natural cationic antimicrobial peptide, targets the endoplasmic reticulum and induces c-FOS, *Biomaterials*, 35 (2014) 3627-3640.
- [102] A.P.F. Corrêa, Obtenção de peptídeos bioativos a partir da hidrólise enzimática de caseinato ovino e soro de queijo ovino, Tese de Doutorado, Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola e do Ambiente, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2013, 103p.
- [103] B.D.G.M. Franco & M. Landgraf, *Microbiologia dos alimentos*, São Paulo: Atheneu, 2008, 176 p.
- [104] N.B. Soares, Obtenção de hidrolisado proteico de torta de soja e avaliação da sua atividade antimicrobiana, Dissertação de mestrado, Programa de Pós-Graduação em Alimentos e Nutrição da Universidade Federal do Estado do Rio de Janeiro, Brasil, (2013) 89 pág.
- [105] M. Hayes, R.P. Ross, G.F. Fitzgerald, C. Hill & Stanton C. Casein-Derived Antimicrobial Peptides Generated by *Lactobacillus acidophilus* DPC6026, *Applied and Environmental Microbiology*, 72(3) (2006) 2260–2264.
- [106] M. D. Guillen & N. Cabo, Characterization of edible oils and lard by Fourier transform infrared spectroscopy. Relationships between composition and frequency of concrete bands in the fingerprint region, *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 74 (1997) 1281–1286.
- [107] A. Rohman & Y.B.C. Man, Fourier transform infrared (FTIR) spectroscopy for analysis of extra virgin olive oil adulterated with palm oil, *Food Research International*, 43 (2010) 886–892.
- [108] A.M. Souza & R.J. Poppi, Experimento didático de quimiometria para análise exploratória de óleos vegetais comestíveis por espectroscopia no infravermelho médio e análise de componentes principais: Um tutorial, Parte I, *Química Nova*, 35(1) (2012) 223-229.
- [109] F.J. Holler, D.A. Skoog & S. R. Crouch, *Princípios de Análise Instrumental*, 6ª ed., Bookman, Porto Alegre, 2009.
- [110] N. Nicolaou & R. Goodacre, Rapid and quantitative detection of the microbial spoilage in milk using Fourier transform infrared spectroscopy and chemometrics, *Analyst*, 133 (2008) 1424–1431.
- [111] N. Nicolaou, Y. Xu & R. Goodacre, Fourier transform infrared spectroscopy and multivariate analysis for the detection and quantification of different milk species, *Journal of Dairy Science*, 93 (2010) 5651–5660.

- [112] X. Duan, D. Ocen, F. Wu, M. Li, N. Yang, J. Xu, H. Chen, L. Huang, Z. Jin & X. Xu, Purification and characterization of a natural antioxidant peptide from fertilized eggs, *Food Research International*, 56 (2014) 18–24.
- [113] Z. Li, B. Wang, C. Chi, Y. Gong, H. Luo, G. Ding, Influence of average molecular weight on antioxidant and functional properties of cartilage collagen hydrolysates from *Sphyrna lewini*, *Dasyatis akjei* and *Raja porosa*, *Food Research International*, 51 (2013) 283–293.
- [114] M.B. Gomes, Determinação de Componentes Principais, *Ciência & Cultura*, 37 (1985) 10-12.
- [115] J.A. Ludwing & J.F. Reynolds, *Statistical Ecology: A primer on methods and computing*, Wiley Interscience Publication, New York (1988).
- [116] W. Odden & O.M. Kvalheim, Application of multivariate modelling to detect hydrocarbon components for optimal discrimination between two source rock types, *Applied Geochemistry*, 15 (2000) 611-627.
- [117] R. Brereton, *Chemometrics for Pattern Recognition*, John Wiley & Sons: Chichester (2007).
- [118] F.K. Wang & T.C.T. Du, Using principal component analysis in process performance for multivariate data, *Omega The International Journal of Management Science*, 28 (2000) 185-194.

## II. CAPÍTULO

### 4. ARTIGO I

(Artigo formatado de acordo com a revista Ultrasonic Sonochemistry)

# **Efeito do ultrassom nas propriedades funcionais e estruturais de hidrolisados de diferentes colágenos bovinos**

## **Efeito do ultrassom nas propriedades funcionais e estruturais de hidrolisados de diferentes colágenos bovinos**

### **RESUMO**

Foi avaliado o efeito do ultrassom nas propriedades funcionais e estruturais de hidrolisados de diferentes colágenos bovinos. Para isso foram realizadas análises físico-químicas, de composição estrutural (espectroscopia na região do infravermelho com Transformada de Fourier), de grau de hidrólise, atividade antioxidante e atividade antimicrobiana. Houve diferença significativa ( $p < 0,05$ ) para umidade, cinzas, proteínas, lipídios, pH, hidroxiprolina e colágeno para as diferentes amostras brutas. Os hidrolisados enzimaticamente com ultrassom prévio ou concomitante apresentaram maior quantidade de bandas em número de onda ( $\text{cm}^{-1}$ ) que as amostras hidrolisadas apenas com enzima ou com ultrassom. As amostras fibra de colágeno em pó e fibra de colágeno apresentaram os maiores valores de proteínas (média de 8,94 e 8,06 mg/mL, respectivamente), mas não diferiram quanto ao grau de hidrólise das amostras de gelatina 1 e gelatina 2. As amostras de hidrolisado 1 e de hidrolisado 2 apresentaram baixos teores de proteínas (7,06 e 7,20 mg/mL, respectivamente) e conseqüentemente os maiores valores de grau de hidrólise (9,99 e 10,3%, respectivamente). As amostras de gelatina 1 e gelatina 2 apesar de terem apresentado valores de proteínas baixos (médias de 7,48 e 7,69 mg/mL, respectivamente), não apresentaram valores de grau de hidrólise tão significativos. A atividade antioxidante da amostra hidrolisado 1 foi aumentada quando realizado o uso do ultrassom para as porcentagens de enzima 0 e 16% e diminuída para 8%. O ultrassom independente da concentração enzimática proporcionou aumento da atividade antioxidante da amostra gelatina 2. Dentre os diferentes tipos de colágeno, independente do tipo de tratamento, os que apresentaram maior atividade antioxidante foram os hidrolisados comerciais: hidrolisado 1 (43,6%) e hidrolisado 2 (41,6%), seguidos das gelatinas, sendo as fibras as que apresentaram menor atividade antioxidante analisando as médias de porcentagem de atividade antioxidante por colágeno. A utilização do ultrassom no processo de hidrólise favoreceu a atividade antimicrobiana, isso pode ser explicado pela melhor ligação do peptídeo com a membrana celular bacteriana, inibindo o crescimento de micro-organismos. Diante disso, pode-se concluir que o ultrassom foi eficaz na hidrólise das amostras, proporcionando maior funcionalidade e rompimento estrutural.

**Palavras-chave:** hidrolisados proteicos, atividade antioxidante, atividade antimicrobiana, FTIR, Alcalase<sup>®</sup>, ultrassom.

## 1. INTRODUÇÃO

Na aplicação do ultrassom, a onda sonora atravessa o meio causando uma série de efeitos, dentre eles, modificações nos fenômenos de transporte de calor e de massa. Estes efeitos são explicados por vários mecanismos associados que podem variar dependendo do ambiente em que a onda acústica se propaga [1], permitindo assim a modificação de produtos ou processos [2, 3].

Pesquisas recentes mostraram que o ultrassom pode modificar a estrutura e as propriedades funcionais das proteínas alimentares [4-7], principalmente de proteínas de origem animal [8, 9]. Pode causar aumento na atividade enzimática pela melhor ligação substrato-enzima e exposição do sítio ativo da enzima. Quando utilizado como pré-tratamento e/ou concomitante ao processo de hidrólise, afeta as ligações de hidrogênio e interações hidrofóbicas, rompendo estruturas terciárias e quaternárias das proteínas devido aos efeitos de cavitação. Essas modificações estruturais possibilitam o acesso da enzima à estrutura, causando um aumento no grau de hidrólise e da bioatividade [10].

Há um crescente interesse pelos processos de extração do colágeno e seus derivados [11] devido à tendência de utilização desta proteína em substituição aos agentes sintéticos nos mais diversos processos industriais e também por permitir uma maior valorização dos subprodutos do abate de animais de açougue. Os colágenos compreendem uma grande e diversificada família de proteínas que são encontradas em todos os tecidos conjuntivos de organismos multicelulares, principalmente em tendões, cartilagens, ligamentos, músculos, ossos desmineralizados, sistema vascular e outros órgãos de vertebrados [12]. É a proteína de origem animal encontrada em maior quantidade e representa aproximadamente 30% da proteína total [13].

A partir de meados de 2000 começaram a surgir pesquisas para obtenção, fracionamento e caracterização de hidrolisados e peptídeos de colágeno [11] objetivando avaliar as propriedades funcionais destes compostos. Os peptídeos derivados de colágeno podem ser obtidos através da hidrólise enzimática utilizando proteases animais ou vegetais [14-16] aplicadas aos subprodutos do abate de bovinos permitindo agregar valor [14, 17]. Os peptídeos de colágeno podem apresentar atividade antimicrobiana, antioxidante e anti-hipertensiva [18-20].

As diferenças entre os diversos tipos de subprodutos de colágeno (gelatina, fibra e colágeno hidrolisado) e a avaliação dos efeitos do ultrassom sobre a hidrólise enzimática, as propriedades funcionais e estruturais dos hidrolisados proteicos ainda é pouco explorada, havendo um amplo campo a ser estudado. O objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito do ultrassom nas propriedades funcionais e estruturais de hidrolisados de diferentes colágenos bovinos.

## 2. MATERIAIS E MÉTODOS

Os diferentes tipos de colágenos bovinos utilizados para obtenção dos hidrolisados proteicos estão apresentados na **Tabela 1**. A Alcalase 2.4L<sup>®</sup> (Novozymes<sup>®</sup>) foi fornecida pela empresa Tovanni Benzaquen Ingredientes (São Paulo, SP, Brasil) e os demais reagentes de grau analítico (PA) foram adquiridos da empresa Sigma-Aldrich Brasil Ltda (São Paulo, SP, Brasil).

### 2.1 Caracterização físico-química dos colágenos

As seguintes análises físico-químicas foram realizadas para caracterização dos colágenos: pH (determinação eletrométrica), lipídios (extração direta em Soxhlet), proteínas (método Kjeldahl modificado), umidade (a 105° C), cinzas (incineração a 550° C), hidroxiprolina (espectrofotometria) e colágeno (fator de correção 8,0), todas estas metodologias conforme IAL [24] e AOAC [25].

### 2.2 Tratamentos

Os diferentes tratamentos utilizados na obtenção dos hidrolisados proteicos de colágeno bovino estão evidenciados na **Tabela 2**.

As reações enzimáticas foram conduzidas seguindo a metodologia utilizada por Schmidt & Salas-Mellado [26] com algumas modificações, onde foram testados 8 e 16% de enzima em relação ao substrato. Nas reações de hidrólise foram utilizados os seguintes equipamentos: banho ultratermostático (Modelo SL152, potência de 2000 W, SOLAB, Piracicaba, SP, Brasil), banho ultrassônico (Modelo ECO-SONICS – Q3.8/40A, potência de 88 W e frequência de 40 KHz, ULTRONIQUE, SERVYLAB, São Leopoldo, RS, Brasil) e centrífuga COLEMAN (Modelo 90 – 1, Santo André, SP, Brasil). Os hidrolisados foram liofilizados em liofilizador TERRONI (Modelo LS3000, São Carlos, SP, Brasil). Para o tratamento EHU o tempo total de processo de hidrólise foi de duas horas, já para o tratamento UEH foi de quatro horas.

### 2.3 Caracterização estrutural dos hidrolisados de colágeno

A análise de FTIR foi realizada de acordo com a metodologia descrita por Demiate *et al.* [27]. Foram analisadas apenas as amostras hidrolisadas com 8% de enzima Alcalase<sup>®</sup>, quando da utilização da mesma na hidrólise. Para análise foi utilizado espectrofotômetro no infravermelho com transformada de Fourier (FTIR) Shimadzu IR-21 Prestige (Shimadzu Corporation, Kyoto, Japão). Os espectros foram recolhidos na faixa de 4.000 - 400 cm<sup>-1</sup>. As pastilhas foram produzidas através da mistura de 100 mg de KBr e 2 mg de amostra liofilizada, sendo prensados em uma prensa hidráulica Carver.

### 2.4 Determinação do grau de hidrólise dos hidrolisados de colágeno

Para determinação do grau de hidrólise utilizou-se o método biureto modificado, conforme sugerido por Bernardini *et al.* [28]. A albumina bovina (Sigma-Aldrich Brasil Ltda, São Paulo, SP, Brasil) foi utilizada como padrão para o método. O grau de hidrólise foi calculado com base na quantidade de proteína dos colágenos brutos.

### 2.5 Determinação da atividade antioxidante dos hidrolisados de colágeno

A atividade antioxidante foi avaliada através do método DPPH de Brand-Willians *et al.* [29] modificado por Sánchez-Moreno *et al.* [30] para medir os parâmetros cinéticos. Foi utilizado espectrofotômetro UV (Modelo UV – M51, BEL Photonics, SERVYLAB, São Leopoldo, RS, Brasil).

### 2.6 Determinação da atividade antimicrobiana dos hidrolisados de colágeno

A Concentração Inibitória Mínima (CIM) foi determinada pelo método indireto de crescimento bacteriano em meio de cultura líquido [31]. Foram testadas apenas amostras hidrolisadas com 8% de enzima Alcalase<sup>®</sup>, quando da utilização da mesma na hidrólise. A determinação da CIM foi realizada sobre bactéria Gram-negativa (*Salmonella choleraesuis* - ATTC 10708) e Gram-positiva (*Staphylococcus aureus* - ATTC 6538), as quais foram previamente crescidas em caldo Luria Bertani (10 g/L triptona, 5 g/L extrato de levedura, 5 g/L NaCl) a 37 °C por 24 horas.

Após o período de crescimento das culturas, foram inoculadas, em micro placas de fundo chato, 10 µL de pré-inóculo de cada bactéria (10<sup>8</sup> UFC.mL<sup>-1</sup>) em um volume final de 300 µL de caldo LB com as diferentes concentrações das formulações de hidrolisados de colágeno previamente diluídas (15 a 30%). Posteriormente, as micro-placas foram incubadas a 35 °C por 24 horas em agitador eletromagnético (60 Hz). Antes e após o período de

incubação, 0 e 24 horas respectivamente, realizou-se a leitura da micro placa, utilizando-se o leitor automático de micro placas (Bio-Tec Instruments Inc., modelo EL800), com comprimento de onda pré-selecionado de 490 nm. A Concentração Inibitória Mínima foi determinada como a menor concentração de hidrolisado de colágeno que não gerou alteração na turbidez, obtida pela diferença entre as leituras realizadas em 24 e 0 horas.

## 2.7 Avaliação estatística

Os resultados das análises físico-químicas dos colágenos foram submetidos à análise de variância univariada (ANOVA) e comparadas pelo teste de Tukey ao nível de 5% de significância pelo programa Action<sup>®</sup> 2.9.

Os espectros de FTIR, depois de coletados, foram suavizados (15 pontos), a linha de base foi corrigida, a zona de CO<sub>2</sub> removida e os dados foram normalizados usando o software Shimadzu IRsolution 1.40. Em seguida, uma tabela com todos os dados foi construída, utilizando o número de onda nas colunas e as amostras nas linhas.

Uma abordagem quimiométrica, incluindo a análise de componentes principais (PCA), foi implementada no Pirouette v. 4.0 (Infometrix<sup>®</sup>, Bothell, WA, EUA). A análise foi realizada na região do espectro compreendendo de 500 a 1722 cm<sup>-1</sup>, e o conjunto de dados foi centrado na média e submetido à primeira derivada.

A PCA é uma técnica de redução de dados, a qual foi aplicada para verificar diferenças entre as amostras e extrair informações importantes dos espectros da FTIR. Foi construído um gráfico de dispersão tridimensional para projetar as amostras [32].

Para avaliação estatística dos dados de proteína (biureto), grau de hidrólise (biureto) e atividade antioxidante (DPPH) foram realizados os seguintes experimentos:

Experimento 1 foi realizado para avaliar qual aplicação de ultrassom, previamente ou concomitante, foi mais eficaz ao tratamento enzimático. Efetuou-se análise do experimento em parcelas subdivididas (*split plot*) com delineamento inteiramente casualizado, sendo os diferentes colágenos distribuídos nas parcelas e as concentrações de enzimas (8 vs. 16%) e aplicação de ultrassom (prévio vs. concomitante) e suas interações distribuídas ao acaso nas subparcelas dentro de cada parcela, conforme o modelo estatístico (Eq. 1):

$$Y_{ijkl} = \mu + \alpha_i + (\alpha\delta)_{il} + \beta_j + \gamma_k + (\beta\gamma)_{jk} + (\alpha\beta)_{ij} + (\alpha\gamma)_{ik} + (\alpha\beta\gamma)_{ijk} + \varepsilon_{ijkl} \quad [1]$$

em que,  $Y_{ijkl}$  = valor observado na  $i$ -ésima parcela,  $l$ -ésima repetição e  $jk$ -ésima subparcela;  $\mu$  = média geral da variável resposta;  $\alpha_i$  = efeito fixo do  $i$ -ésimo colágeno;  $(\alpha\delta)_{il}$  = efeito residual das parcelas (erro A);  $\beta_j$  = efeito fixo da  $j$ -ésima concentração enzimática;  $\gamma_k$  =

efeito fixo da  $k$ -ésima aplicação do ultrassom;  $(\beta\gamma)_{jk}$  = efeito fixo da interação entre a  $j$ -ésima concentração enzimática e a  $k$ -ésima aplicação do ultrassom;  $(\alpha\beta)_{ij}$  = efeito fixo da interação entre o  $i$ -ésimo colágeno e a  $j$ -ésima concentração enzimática;  $(\alpha\gamma)_{ik}$  = efeito fixo da interação entre o  $i$ -ésimo colágeno e a  $k$ -ésima aplicação do ultrassom;  $(\alpha\beta\gamma)_{ijk}$  = efeito fixo da interação entre o  $i$ -ésimo colágeno, a  $j$ -ésima concentração enzimática e  $k$ -ésima aplicação do ultrassom;  $\varepsilon_{ijkl}$  = efeito residual das subparcelas (erro B) ou efeito aleatório associado a  $ijkl$ -ésima observação, suposto  $\varepsilon_{ijkl} \stackrel{iid}{\sim} N(0, \sigma^2)$ .

Experimento 2 foi conduzido para avaliar o efeito do colágeno, concentração enzimática e aplicação ou não de ultrassom prévio. Efetuou-se análise do experimento em parcelas subdivididas (*split plot*) com delineamento inteiramente casualizado, sendo os diferentes colágenos distribuídos nas parcelas e as concentrações de enzimas (0, 8 e 16%) e aplicação ou não de ultrassom (sem US vs. com US prévio) e suas interações distribuídas ao acaso nas subparcelas dentro de cada parcela, conforme o modelo estatístico descrito acima.

Os dados foram sujeitos a investigação de *outliers* a partir dos resíduos estudentizados. Posteriormente, foram submetidos à análise de variância univariada (ANOVA) pelo procedimento GLM, suas médias ajustadas pelo método dos quadrados mínimos ordinários como comando LSMEANS e comparadas pela diferença mínima significativa (teste t) ao nível de 5% de significância. Além disso, foi realizada análise de correlação de Spearman entre as variáveis estudadas.

As análises estatísticas foram executadas no aplicativo SAS<sup>®</sup> System for Windows<sup>™</sup> versão 9.4 (SAS Institute Inc., Cary - NC, USA).

### 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

#### 3.1 Caracterização físico-química dos colágenos

Houve diferença significativa ( $p < 0,05$ ) para umidade, cinzas, proteínas, lipídios, pH, hidroxiprolina e colágeno para as diferentes amostras de colágenos brutos (**Tabela 3**).

As amostras GEL e ROU apresentaram os maiores valores de umidade, o que é explicado pelas diferenças no processo de secagem desses colágenos durante a produção industrial. As amostras PEP, PTL e FP apresentaram valores intermediários e semelhantes de umidade.

Para cinzas a amostra que apresentou maior teor foi FP, enquanto que as demais amostras apresentaram resultados semelhantes. A variação no teor de cinzas entre as amostras

pode ser explicada pelos diferentes tipos de matérias-primas utilizadas na extração desses colágenos.

Em relação ao teor de proteína, a amostra PTL apresentou o maior valor e a amostra FP, o menor. As gelatinas apresentaram valores semelhantes para o teor de proteínas. O teor de proteínas dos colágenos é afetado pelo método de extração dos mesmos, sendo que processos mais drásticos de extração resultam em menores teores de proteínas, pois afetam severamente a estrutura protéica, quebrando-a em menores frações.

No presente estudo foram encontrados elevados teores de proteínas nos hidrolisados de colágeno, concordando com o estudo de Sila *et al.* [33], onde o hidrolisado de proteínas de peixe (*Barbus barbus*) apresentou elevado teor de proteína ( $81,43 \pm 0,73\%$ ), o que foi atribuído a solubilização dessas durante a hidrólise, a remoção de substâncias não protéicas e a remoção parcial dos lipídios após a hidrólise. O hidrolisado de proteínas de peixe apresentou teor de gordura e de umidade igual a  $10,53 \pm 0,11$  e  $2,21 \pm 0,09\%$ , respectivamente. Em uma pesquisa realizada com extratos de proteínas sarcoplasmáticas da carne de peito bovino e com o hidrolisado do extrato foram encontrados teores de proteína iguais a  $0,478 \pm 0,085$  g de proteína/g de amostra seca e  $0,332 \pm 0,052$  g de proteína/g de amostra seca, respectivamente [28].

Analisando os valores médios de lipídios percebe-se que a amostra FB apresentou o maior teor, seguida pela amostra FP, enquanto as demais amostras apresentaram valores semelhantes. Essas diferenças são decorrentes do processo de produção dos colágenos, onde, anteriormente ao processo de extração, as matérias-primas passam por um pré-tratamento para remoção de substâncias não colagenosas, dentre elas a gordura.

A amostra FB apresentou maior valor de pH, de 6,72. O pH final dos colágenos depende das etapas utilizadas no processo de extração. Esse pH perto da neutralidade reflete de uma etapa de correção do pH (neutralização) no processo de extração da amostra FB.

Embora GEL e ROU sejam provenientes de fabricantes diferentes, as mesmas apresentaram valores similares para as variáveis analisadas, provavelmente porque foram obtidas de processos e matérias-primas semelhantes. O tratamento empregado, ácido ou alcalino, é o que determina o tipo de gelatina obtida, podendo-se obter dois tipos: a gelatina tipo A (ponto isoelétrico em pH 8-9) e gelatina tipo B (ponto isoelétrico em pH 4-5) [34-15]. As amostras PEP e PTL apresentaram teores de proteínas e valores de pH distintos. As amostras FB e FP, fabricadas pela mesma empresa, apresentaram valores dessemelhantes para todas as características físico-químicas, devido aos processos de produção serem distintos.

Um dos aminoácidos responsáveis pela manutenção da estabilidade da tripla hélice (estrutura secundária do colágeno) é a hidroxiprolina. Sua ausência ou baixa concentração no colágeno faz com que este perca a conformação de tripla hélice quando submetido a altas temperaturas [15], prejudicando assim, as propriedades de gelificação.

As amostras de colágeno que apresentaram maior teor de hidroxiprolina e colágeno foram os hidrolisados PTL e PEP. Estas amostras apresentaram teores praticamente iguais para ambas as análises, provavelmente por serem fabricadas pela mesma indústria e, conseqüentemente, serem obtidas da mesma matéria-prima, entretanto submetidas a tratamentos de extração diferentes, hidrólise química e enzimática e hidrólise parcial alcalina, respectivamente. A amostra FB, por sua vez, apresentou o menor teor para ambos componentes, o que se deve ao tratamento de extração dessa amostra ser mais drástico (tratamento alcalino). Era esperado que as amostras apresentassem altos teores de hidroxiprolina e de colágeno, sendo que os valores encontrados variaram de 10,8 a 12,9 g/100 g para hidroxiprolina e de 86,3 a 100,0 g/100 g para colágeno.

### 3.2 Caracterização estrutural dos hidrolisados de colágeno bovino

A espectroscopia na região do infravermelho é uma das análises experimentais mais antiga e bem estabelecida para analisar a estrutura secundária de polipeptídios e proteínas [35].

Os resultados da análise de componentes principais (PCA) indicaram que as amostras foram separadas em quatro grupos distintos de acordo com a similaridade das bandas (Fig. 1) explicando 85,57% da variância dos dados. Os hidrolisados FP HU, GEL HU e FB HU agruparam-se no 1º quadrante, já ROU HU, PEP HU e PTL HU agruparam-se entre 1º e 2º quadrante; esses dois últimos por serem amostras já hidrolisadas apresentaram menor tamanho estrutural quando tratados com ultrassom. ROU UEH, GEL UEH, PEP UEH, PTL UEH, PEP EH, ROU EH, FB EH, PTL EH e PTL EHU agruparam-se entre o 2º e 3º quadrante, enquanto os hidrolisados FB UEH, GEL EH, PEP EHU, ROU EHU, FP EHU, GEL EHU, FP UEH, FP EH e FB EHU agruparam-se no 3º quadrante. Para as amostras PEP, ROU, GEL, PTL e FB o tratamento que resultou em maior rompimento estrutural foi o EHU, ao passo que para FP foi o UEH.

Em estudo realizado por Duan *et al.* [36] também foi utilizada a análise de espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier, buscando-se a verificação da predição conformacional da estrutura secundária do peptídeo purificado de transferrina do ovo. Os resultados sugeriram que a conformação do peptídeo era baseada em  $\beta$ -folhas.

Os hidrolisados enzimaticamente com ultrassom prévio ou concomitante apresentaram maior quantidade de bandas em número de onda ( $\text{cm}^{-1}$ ) que as amostras hidrolisadas apenas com enzima ou com ultrassom, indicando que esta tecnologia potencializou o processo de hidrólise dessas amostras. Isso não quer dizer que as menores estruturas resultaram em maior atividade antioxidante, pois o que determina a maior atividade antioxidante é a capacidade da molécula em capturar radicais livres. Pode-se inferir que cada tipo de colágeno requer um tratamento de hidrólise específico, não tendo o mesmo efeito para amostras com propriedades diferentes em decorrência dos processos de obtenção desses colágenos.

### **3.3 Resultados probabilísticos da avaliação do efeito do ultrassom prévio ou concomitante ao processo de hidrólise enzimática**

Observou-se que o efeito do colágeno, enzima, interação colágeno x enzima foi significativo ( $p < 0,0001$ ) para as variáveis proteína (ptn), grau de hidrólise (GH) e atividade antioxidante (AA) (**Tabela 4**). O efeito da interação enzima x ultrassom foi significativo ( $p < 0,0001$ ) para todas as variáveis, ou seja, o efeito do ultrassom na hidrólise dos diferentes colágenos bovinos, de acordo com sua aplicação, pode ou não inibir a atividade enzimática, dependendo das condições impostas ao meio.

Como se esperava, houve correlação negativa ( $p < 0,001$ ) entre os valores de proteína (ptn) e grau de hidrólise (GH) ( $r = -0,73$ ) (**Tabela 5**). Os maiores teores de proteínas residuais (após o processo de hidrólise) resultaram em menor grau de hidrólise. Este fato pode ser explicado pela menor atuação da enzima durante o processo de hidrólise, a qual pode ter sido afetada negativamente pelo ultrassom, pela quantidade excessiva de enzima no meio (inibição por excesso de enzima) e a escassez de substrato.

### **3.4 Resultados médios totais de proteína (ptn), grau de hidrólise (GH) e atividade antioxidante (AA) sob efeito da interação enzima vs. ultrassom da avaliação do efeito do ultrassom prévio ou concomitante ao processo de hidrólise enzimática**

Avaliando o efeito do ultrassom prévio dentro das diferentes porcentagens de enzima testadas (16 e 8%) verificou-se que o valor de proteína residual foi maior para 8% e menor para 16% de enzima (**Tabela 6**). Essa diferença no teor protéico se deve a maior quantidade disponível de enzima no meio para hidrólise do substrato.

As amostras tratadas com ultrassom prévio e 16% de enzima apresentaram menor teor de proteína residual, significando que a aplicação prévia do ultrassom favoreceu a atuação enzimática na hidrólise (grau de hidrólise igual a 6,23%), gerando peptídeos com menores

massas moleculares, entretanto isso não significa que peptídeos com maior poder antioxidante foram gerados. A utilização de ultrassom como pré-tratamento ao processo de hidrólise alterou a conformação das proteínas, facilitando o acesso da enzima, causando um aumento no grau de hidrólise e na bioatividade. A alteração causada pelo ultrassom depende da natureza da proteína e do seu grau de desnaturação e agregação [7].

Resultados contrários foram encontrados por Yu *et al.* [37], os quais verificaram que a aplicação de ultrassom ( $278,8 \pm 7,4$  W, 40 kHz) durante 30-60 minutos, sob temperatura controlada de 0-4 °C inibiu a atividade das enzimas  $\alpha$ -amilase e papaína. Em contrapartida, usando as mesmas condições de processo, a atividade da pepsina foi ativada. Esses efeitos foram atribuídos as alterações na sua estrutura secundária e terciária. Em outro estudo estes mesmos autores avaliaram a influência do ultrassom na atividade da tirosinase e os resultados mostraram aumento da atividade da enzima ocasionado pela melhor ligação substrato-enzima e exposição do sítio ativo da enzima [38].

O ultrassom concomitante ao processo de hidrólise não proporcionou variação nos teores de proteína residual para as diferentes porcentagens de enzima testadas. O que se esperava era que valores menores de proteína residual fossem encontrados, pois significaria que durante o processo de hidrólise enzimática frações peptídicas menores teriam sido geradas. Em contrapartida, no estudo de O'Sullivan *et al.* [9] em que o ultrassom de alta intensidade foi aplicado à proteína da clara do ovo (EWP), foi obtida uma redução no tamanho da EWP com o aumento do tempo de sonicação. Tal efeito foi atribuído à interrupção das interações hidrofóbicas e eletrostáticas. Além disso, tem sido observado que o ultrassom aumenta a hidrofobicidade e a estabilidade da emulsão de EWP [7, 9, 39].

A atividade antioxidante se mostrou maior para amostras hidrolisadas com 16% de enzima e ultrassom prévio. Resultado semelhante foi encontrado por Knezevic-Jugovic *et al.* [40] que compararam os efeitos do ultrassom e processamento de alta pressão com dióxido de carbono sobre a hidrólise proteolítica de proteínas da clara do ovo e atividade antioxidante dos hidrolisados obtidos. Os resultados encontrados pelos autores evidenciaram que a combinação de ultrassom como pré-tratamento (1 hora, 30 kHz, pH 8,3) e a subsequente hidrólise enzimática com alcalase (50 °C e pH 8,0) aumentou a atividade antioxidante dos hidrolisados obtidos.

Para avaliação do efeito dos diferentes tipos de colágeno, da enzima e do ultrassom sobre as diferentes variáveis analisadas escolheu-se o ultrassom prévio como tratamento, sendo levado em consideração que o ultrassom concomitante ao processo de hidrólise

enzimática pode inibir ou prejudicar a atividade da enzima durante a hidrólise e que a utilização do ultrassom prévio resultou em maior grau de hidrólise e atividade antioxidante.

### **3.5 Valores probabilísticos do efeito do ultrassom (prévio), da enzima (0, 8 e 16%) e dos diferentes tipos de colágeno para proteína, grau de hidrólise e atividade antioxidante**

O efeito da interação colágeno x enzima x ultrassom foi significativo ( $p < 0,001$ ) para todas as variáveis, ou seja, as variações nos valores médios das mesmas estão diretamente ligadas com o tipo de colágeno, porcentagem de enzima e utilização ou não do ultrassom no processo de hidrólise, podendo esses afetar diretamente a funcionalidade dos peptídeos gerados na hidrólise (**Tabela 7**).

Como era esperado houve correlação negativa ( $p < 0,001$ ) entre os valores de proteína e grau de hidrólise ( $r = -0,73$ ), teores maiores de proteína resultaram em menor grau de hidrólise, mostrando menor atuação da enzima e do ultrassom frente ao substrato (**Tabela 8**). Os valores de proteína e atividade antioxidante apresentaram correlação negativa ( $p < 0,001$ ) ( $r = -0,45$ ) representando que quanto maior for o valor de proteína menor a atividade antioxidante, o que se deve ao menor número de peptídeos gerados no processo de hidrólise.

Os valores de grau de hidrólise e atividade antioxidante apresentaram correlação positiva ( $p < 0,001$ ) ( $r = 0,54$ ), onde maiores valores de grau de hidrólise resultaram em maiores valores de atividade antioxidante, ou seja, quanto mais hidrolisado foi o colágeno (dentro das condições testadas – hidrólise por ultrassom, hidrólise enzimática, hidrólise enzimática assistida por ultrassom e tratados previamente com ultrassom e posterior hidrólise enzimática) maior foi a atividade antioxidante.

### **3.6 Resultados médios de proteína e grau de hidrólise para as diferentes amostras de hidrolisados de colágeno sob efeito da interação ultrassom vs. enzima vs. colágeno**

A amostra FB bruta apresentou valor médio de proteína igual a 8,21 mg/mL, já quando tratada com ultrassom seu teor de proteína reduziu para 7,62 mg/mL, representando grau de hidrólise igual a 8,27% (**Tabela 9**). O decréscimo no valor de proteína foi provocado pela cavitação do meio, a qual provoca o rompimento da estrutura protéica, gerando frações menores. Para a amostra FB o ultrassom prévio foi benéfico ao processo de hidrólise, o que pode ser explicado pela capacidade do ultrassom em romper moléculas facilitando a ligação enzima/substrato.

Bernardini *et al.* [28] testaram extratos de proteínas sarcoplasmáticas da carne de peito bovino e o hidrolisado dos extratos quanto ao seu teor peptídico, utilizando o ensaio de

biureto a uma concentração de 20 mg/mL para análise. O teor de proteína expresso como média e desvio padrão das proteínas sarcoplasmáticas foi de  $12,68 \pm 1,48 \mu\text{g}/\mu\text{L}$ , o teor de proteínas do hidrolisado foi de  $2,90 \pm 0,75 \mu\text{g}/\mu\text{L}$ . Diniz & Martin [41] estudaram o efeito do pH, da temperatura e a proporção de enzima/substrato no grau de hidrólise de proteína de músculo de cação com a enzima alcalase e encontraram 15,6% de grau de hidrólise com uma concentração de enzima/substrato 2%.

A amostra FP tratada com 0 e 8% de enzima e sem utilização de ultrassom apresentou valores de proteína iguais a 8,79 e 8,16 mg/mL respectivamente, já quando tratada com ultrassom o teor de proteína aumentou para 9,58 e 10,2 mg/mL, esse aumento do teor proteico das amostras pode ser justificado pela melhor diluição do substrato após a hidrólise, pois a amostra de FP bruta possui baixa solubilidade. A utilização do ultrassom na hidrólise enzimática da amostra FP não favoreceu a quebra das proteínas em frações menores, apenas a utilização de 8% de enzima. Para as amostras de FP tratadas com 0 e 16% de enzima a utilização ou não do ultrassom levou a valores de grau de hidrólise semelhantes, mas para 8% de enzima ocasionou valores distintos, onde a amostra tratada sem ultrassom apresentou grau de hidrólise igual a 7,18%, enquanto que a amostra tratada com ultrassom não sofreu hidrólise. A amostra FP apresentou maior grau de hidrólise quando não tratada com ultrassom, diferentemente da amostra de FB.

A utilização de ultrassom na hidrólise da amostra PEP, independente da porcentagem de enzima utilizada, proporcionou a geração de valores de proteína residual e grau de hidrólise semelhantes a não utilização de ultrassom, entretanto valores maiores de enzima resultaram em menores teores de proteína residual e maiores valores de grau de hidrólise.

Para a amostra PTL a utilização ou não de ultrassom gerou teores de proteína residual semelhantes quando utilizado as porcentagens de enzima de 0 e 16. Já a combinação de 8% de enzima e ultrassom prévio provocaram o aumento de proteína residual, ou seja, a hidrólise ocorreu em menor extensão. Foi evidenciado que quanto maior a concentração de enzima utilizada na hidrólise, menor o teor de proteína residual da amostra, mostrando que a hidrólise de proteínas maiores ocorreu. O ultrassom não interferiu no valor de grau de hidrólise da amostra PTL tratada com 0% de enzima, mas para os tratamentos com 8 e 16% de enzima interferiu. A amostra PTL tratada com 16% de enzima e com ultrassom apresentou maior valor de grau de hidrólise. Então, pode-se verificar que o ultrassom e as maiores concentrações de enzima no processo de hidrólise dessa amostra resultaram em valores maiores de grau de hidrólise.

Os teores de proteína para a amostra GEL, quando tratada com 0 ou 16% de enzima, foram semelhantes quanto a utilização ou não do ultrassom. Já a utilização de 8% de enzima e do ultrassom acarretou na diminuição do teor protéico da amostra, mostrando maior eficiência do processo. O ultrassom proporcionou maiores valores de grau de hidrólise para as amostras de GEL tratadas com 0 e 8% de enzima. A utilização ou não do ultrassom na hidrólise das amostras de GEL tratadas com 16% de enzima proporcionou valores de grau de hidrólise semelhantes. Maiores valores de grau de hidrólise para a amostra GEL foram proporcionados pelo uso do ultrassom ao processo de hidrólise.

A porcentagem de 16% de enzima proporcionou maior hidrólise da amostra de ROU do que as demais porcentagens. Os resultados evidenciam que a utilização de ultrassom e de concentração de enzima igual a 16% proporcionaram a amostra ROU maior valor de grau de hidrólise. O ultrassom foi benéfico para aumentar o grau de hidrólise para a amostra ROU.

Giménez *et al.* [42] também evidenciaram aumento no grau de hidrólise utilizando no processo enzima alcalase. Realizaram a hidrólise de amostras de gelatinas de linguado e lulas a 50 °C durante três horas, e obtiveram grau de hidrólise entre 35 e 50%. Os autores relatam que as velocidades de hidrólise foram elevadas na fase inicial (15-20 min) e depois diminuíram gradualmente até atingir uma fase estacionária, quando nenhuma hidrólise aparente ocorreu.

As amostras FP e FB apresentaram os maiores valores de proteínas, provavelmente por serem amostras brutas, sem terem passado por nenhum processo de hidrólise anterior, mas não diferiram quanto ao grau de hidrólise das amostras GEL e ROU. As amostras PTL e PEP apresentaram baixos teores de proteínas e conseqüentemente os maiores valores de grau de hidrólise apesar de já terem passado por processo de hidrólise, o que mostra que as mesmas encontravam-se mais biodisponíveis ao processo de hidrólise enzimática e que o ultrassom favoreceu o processo. As amostras GEL e ROU apesar de terem apresentado valores de proteínas baixos, não apresentaram valores de grau de hidrólise tão significativos como se esperava.

A atividade específica da enzima está relacionada com o grau de hidrólise, ou seja, quanto maior a atividade da enzima maior a quebra das proteínas em peptídeos menores, entretanto o controle do grau de hidrólise deve ser rígido, pois valores muito altos prejudicam as propriedades funcionais dos hidrolisados [43]. O ultrassom, de uma forma geral, proporcionou os maiores graus de hidrólise o que evidencia que sua utilização é benéfica ao processo de hidrólise de diferentes tipos de colágeno.

### **3.7 Resultados médios de atividade antioxidante para as diferentes amostras de hidrolisados de colágeno sob efeito da interação ultrassom vs. enzima vs. colágeno**

Para as amostras FB e FP a utilização de ultrassom no processo de hidrólise enzimática não foi interessante, pois o mesmo resultou em menores valores de atividade antioxidante ou em valores semelhantes quando comparado a não utilização deste (**Tabela 9**). Já a utilização de enzima na hidrólise dessas amostras proporcionou maiores valores de atividade antioxidante. O ultrassom não provocou o aumento da atividade antioxidante das amostras PEP e GEL, entretanto pode-se verificar que a concentração enzimática de 16% gerou valores maiores de atividade antioxidante. A atividade antioxidante da amostra PTL foi aumentada quando realizado o uso do ultrassom para as porcentagens de enzima 0 e 16% e diminuída para 8%.

Para as amostras de ROU, tratadas com 8 e 16% de enzima, o ultrassom proporcionou maiores valores de atividade antioxidante. O ultrassom foi benéfico no aumento da atividade antioxidante da amostra ROU. Para as demais amostras sua utilização não levou ao aumento da atividade antioxidante.

Dentre os diferentes tipos de colágeno, independente do tipo de tratamento, os que apresentaram maior atividade antioxidante foram os hidrolisados, PTL e PEP (amostras com estruturas protéicas menores e mais biodisponíveis para hidrólise), seguidos das gelatinas (amostras parcialmente hidrolisadas em meio alcalino, tratamento drástico), sendo as fibras (amostras com estruturas protéicas maiores, mais integras) as que apresentaram menor atividade antioxidante analisando as médias de porcentagem de atividade antioxidante por colágeno.

Kangsanant *et al.* [44] utilizaram tratamentos com ultrassom parecidos com os do presente trabalho. Os autores estudaram a aplicação do ultrassom de alta intensidade como pré-tratamento e concomitante à hidrólise da proteína muscular de tilápia com a enzima Flavourzyme<sup>®</sup> e o seu efeito sobre a bioatividade dos hidrolisados obtidos, tais como a atividade antioxidante e anti-inflamatória. Ao contrário do presente trabalho, o pré-tratamento com ultrassom de alta intensidade (70 W), 30 e 45 min, combinado com hidrólise convencional se mostrou a condição ideal para a produção de hidrolisados de tilápia com atividade inibidora de óxido nítrico e antioxidante (*in vitro*). Já a atividade antioxidante encontrada por Bernardini *et al.* [28] para hidrolisado de proteínas sarcoplasmáticas da carne de peito bovino utilizando o método de análise DPPH foi de  $18,68 \pm 2,78\%$ .

Nos peptídeos com alta atividade antioxidante são encontrados resíduos de histidina, prolina, tirosina, metionina, cisteína, sendo as propriedades antioxidantes intrínsecas a cada

resíduo de aminoácido. A histidina, aminoácido considerado como o de maior atividade antioxidante, tem sua propriedade antioxidante associada ao grupo imidazol e a cisteína, ao grupo tiol [45]. Aminoácidos como a alanina, leucina e glicina também foram encontrados nas sequências de peptídeos antioxidantes [46, 47].

O presente estudo não realizou a purificação dos hidrolisados, diferentemente do estudo realizado por Rajapakse *et al.* [48], onde o peptídeo purificado obtido de derivados de mexilhão azul marinho (*Mytilus edulis*), com sequência de aminoácidos His-Phe-Gly-Asp-Pro-Phe-His, apresentou atividade antioxidante de 72%, sendo utilizado o mesmo método de análise do presente estudo, ou seja, o ensaio de inibição do radical 2,2-difenil-1picrilhidrazil (DPPH). Peptídeos purificados de 1 a 10 kDa obtidos por Wang *et al.* [49], a partir de hidrolisados da clara do ovo em pó, apresentaram atividade antioxidante (método de análise DPPH) igual a 62,64%.

### **3.8 Resultados de atividade antimicrobiana para os hidrolisados de colágeno**

Para a inibição da bactéria Gram-negativa *Salmonella choleraesuis* as amostras que se mostraram mais eficazes foram FB UEH, PTL EH e ROU EHU, concentração de amostra igual a 20%, e para a bactéria Gram-positiva *Staphylococcus aureus* foram FB EHU, PEP EHU e ROU EH, concentração de amostra igual a 17,5% (resultados não mostrados).

A utilização do ultrassom no processo de hidrólise favoreceu a atividade antimicrobiana, o que pode ser explicado pela melhor ligação do peptídeo com a membrana celular bacteriana, inibindo o crescimento de micro-organismos.

No estudo realizado por Rocha *et al.* [50], os quais testaram filmes a base de proteínas de anchoita (*Engraulis anchoita*) junto a ácidos orgânicos frente à bactéria *Staphylococcus aureus*, não foi encontrada zona de inibição do micro-organismo, diferentemente do presente estudo. Os micro-organismos podem utilizar o nitrogênio presente nos aminoácidos como fonte de nutriente, metabolizando nucleotídeos, peptídeos e proteínas complexas. As enzimas secretadas pelas bactérias podem hidrolisar uma vasta variedade de substratos protéicos [51]. Os peptídeos purificados podem atuar como inibidores ou ativadores do crescimento de micro-organismos, os quais podem ser utilizados como fonte de carbono, o qual favorece o crescimento bacteriano [52].

## **4. CONCLUSÃO**

O ultrassom foi benéfico na hidrólise estrutural dos colágenos. O ultrassom concomitante ao processo de hidrólise enzimática das amostras hidrolisado 1, gelatina 2,

gelatina 1, fibra e hidrolisado 2 proporcionou maiores quantidades de bandas em número de onda ( $\text{cm}^{-1}$ ), já para a amostra fibra pó foi o ultrassom prévio.

O ultrassom prévio e a concentração enzimática de 16% se mostraram mais eficazes no processo de hidrólise das amostras, conferindo-lhes melhores resultados de grau de hidrólise e atividade antioxidante. O tratamento que proporcionou maior atividade antioxidante para as amostras fibra pó e fibra foi o sem ultrassom e com 8% de enzima, já para as amostras gelatina 1, hidrolisado 2, gelatina 2 e hidrolisado 1 foi o com ultrassom prévio e 16% de enzima. Os resultados evidenciaram que nem sempre maior grau de hidrólise resulta em maior atividade antioxidante, pois valores muito altos podem prejudicar as propriedades funcionais dos hidrolisados, todavia isso depende diretamente do tipo de amostra utilizada e do processo de obtenção destas.

As amostras que mostraram maior atividade antimicrobiana frente à *Salmonella choleraesuis* foram fibra tratada com ultrassom previamente a hidrólise enzimática, hidrolisado 2 hidrolisado enzimaticamente e gelatina 2 hidrolisada com enzima e ultrassom concomitante. Para *Staphylococcus aureus* foram a fibra e o hidrolisado 1, hidrolisados com enzima e ultrassom concomitante e gelatina 2 hidrolisada enzimaticamente, mostrando que o ultrassom favoreceu a ligação do peptídeo com a membrana celular bacteriana inibindo o crescimento de micro-organismos.

Diante disso, pode-se concluir que o ultrassom potencializou a hidrólise das amostras, proporcionando maior funcionalidade e rompimento estrutural.

## 5. AGRADECIMENTOS

A FAPERGS e ao CNPQ pela ajuda financeira para aquisição de equipamentos e de reagentes, como também de bolsas de iniciação científica. As empresas Novaprom e Rousselot pela doação das amostras utilizadas nesse estudo. A Universidade Estadual de Ponta Grossa e a Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e das Missões pela ajuda com as análises de espectroscopia na região do infravermelho com transformada de Fourier e antimicrobianas. Ao Edital Capes nº 27/2010 – Pró – Equipamentos Institucional pela possibilidade de utilização do liofilizador. A Universidade Federal de Santa Maria pela infraestrutura disponibilizada e pelas bolsas de iniciação científica concedidas. A CAPES pela bolsa de pós-graduação e ao Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos.

## 6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] J.A. Cárcel, J.V. García-Pérez, J. Benedito & A. Mulet, Food process innovation through new technologies: Use of ultrasound, *Journal of Food Engineering*, 110(2) (2012) 200–207.
- [2] F. Chemat, Zill-E-Huma, & M.K. Khan, Applications of ultrasound in food technology: Processing, preservation and extraction, *Ultrasonics Sonochemistry*, 18(4) (2011) 813–835.
- [3] Y. Tao & D.-W. Sun, Enhancement of food processes by ultrasound: A review, *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 55(4) (2015) 570–594.
- [4] M. Ashokkumar, Applications of ultrasound in food and bioprocessing, *Ultrasonics Sonochemistry*, 25 (2015) 17–23.
- [5] A.C. Soria & M. Villamiel, Effect of ultrasound on the technological properties and bioactivity of food: a review, *Trends in Food Science & Technology*, 21(7) (2010) 323–331.
- [6] J. Chandrapala, B. Zisu, M. Palmer, S. Kentish & M. Ashokkumar, Effects of ultrasound on the thermal and structural characteristics of proteins in reconstituted whey protein concentrate, *Ultrasonics Sonochemistry*, 18(5) (2011) 951–957.
- [7] C. Arzeni, K. Martínez, P. Zema, A. Arias, O.E. Pérez & A.M.R. Pilosof, Comparative study of high intensity ultrasound effects on food proteins functionality, *Journal of Food Engineering*, 108(3) (2012a) 463–472.
- [8] A.R. Jambrak, T.J. Mason, V. Lelas & G. Krešić, Ultrasonic effect on physicochemical and functional properties of  $\alpha$ -lactalbumin LWT, *Food Science and Technology*, 43 (2) (2010) 254–262.
- [9] J. O'Sullivan, B. Murray, C. Flynn & I. Norton, The effect of ultrasound treatment on the structural, physical and emulsifying properties of animal and vegetable proteins, *Food Hydrocolloids*, 53 (2015) 141-154.
- [10] C. Ozuna, I.P. Martínez, E. C. Tostado, L. Ozimek & S. L. Amaya-Llano, Innovative applications of high-intensity ultrasound in the development of functional food ingredients: Production of protein hydrolysates and bioactive peptides, *Food Research International*, 77 (2015) 685–696.
- [11] E.A. Decker & Y. Park, Healthier meat products as functional foods, *Meat Science*, 86 (2010) 49-55.
- [12] Z.Y. Liu, A.C.M. Oliveira & Y.C. Su, Characterization of pepsin-solubilized collagen from skin and connective tissue of giant red sea cucumber (*Parastichopus californicus*), *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 58 (2010) 1270–1274.
- [13] F. Pati, B. Adhikari & S. Dhara, Isolation and characterization of fish scale collagen of higher thermal stability, *Bioresource Technology*, 101 (2010) 3737-3742.

- [14] J.D. Webster, D.A. Ledward & R.A. Lawrie, Protein hydrolysates from meat industry by-products, *Meat Science*, 7 (1982) 147-157.
- [15] M.C. Gómez-Guillén, B. Giménez, M.E. López-Caballero & M.P. Montero, Functional and bioactive properties of collagen and gelatin from alternative sources: A review, *Food Hydrocolloids*, 25 (2011) 1813-1827.
- [16] M.I. Khan, M.S. Arshad, F.M. Anjum, A. Sameen, A. Rehman & W. Gill, Meat as a functional food with special reference to probiotic sausages, *Food Research International*, 44 (2011) 3125-3133.
- [17] R.D. Bernardini, P. Harnedy, D. Bolton, J. Kerry, E. O'Neill, A.M. Mullen & M. Hayes, Antioxidant and antimicrobial peptidic hydrolysates from muscle protein sources and by-products, *Food Chemistry*, 134 (2011) 1296-1307.
- [18] B. Li, F. Chen, X. Xang, B. Ji & Y. Wu, Isolation and identification of antioxidative peptides from porcine collagen hydrolysate by consecutive chromatography and electrospray ionization-mass spectrometry, *Food Chemistry*, 102 (2007) 1135-1143.
- [19] S.K. Kim, H.G. Byun, P.J. Park & F. Shahidi, Angiotensin I-converting enzyme inhibitory peptides purified from bovine skin gelatin hydrolysate, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49 (2001) 2992-2997.
- [20] G. Herregods, J. Camp, M. Morel, B. Ghesquiere, K. Gevaert, L. Vercruyssen, et al. Angiotensin I-converting enzyme inhibitory activity of gelatin hydrolysates and identification of bioactive peptides, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 59 (2011) 552-558.
- [21] R.C. Prestes, A. Graboski, S. S. Roman, A. P. Kempka, G. Toniazzo, I. M. Demiate & M. Diluccio, Effects of the addition of collagen and degree of comminution in the quality of chicken ham, *Poultry Science Association*, 22 (2013) 885-903.
- [22] Rousselot, Certificado de Análise, Rousselot Gelatinas do Brasil Ltda, (2014).
- [23] Gelita, Certificado de Análises, Gelita do Brasil Ltda, (2014).
- [24] Instituto Adolfo Lutz, Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), Métodos Físico-Químicos para Análises de Alimentos, Ministério da Saúde, Agência Nacional de Vigilância Sanitária, Brasília, Ministério da Saúde, 2005.
- [25] Association of Official Analytical Chemists, Official Methods of Analysis of AOAC INTERNATIONAL, (2016).
- [26] C.G. Schmidt & M. Sallas-Mellado, Influência da ação das enzimas alcalase e flavourzyme no grau de hidrólise das proteínas de carne de frango, *Química Nova*, 32(5) (2009) 1144-1150.

- [27] I.M. Demiate, N. Dupuy, J.P. Huvenne, M.P. Cereda & G. Wosiacki, Relationship between baking behavior of modified cassava starches and starch chemical structure determined by FTIR spectroscopy, *Carbohydrate Polymers*, 42 (2000) 149-158.
- [28] R.D. Bernardini, A.M. Mullen, D. Bolton, J. Kerry, E. O'Neill & M. Hayes, Assessment of the aniotensin-I-converting enzyme (ACE-I) inhibitory and antioxidant activities of hydrolysates of bovine brisket sarcoplasmatic proteins produced by papain and characterization of associate bioactive peptidic fractions, *Meat Science*, 90 (2012) 226-235.
- [29] W. Brand-Williams, M.E. Cuvelier & C. Berset, Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity, *Food Science and Technology*, 28 (1995) 25-30.
- [30] C. Sanchez-Moreno, J.A. Larrauri & F. Saura-Calixto, A procedure to measure the antiradical efficiency of polyphenols, *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 76(2) (1998) 270-276.
- [31] I. Gaio, A.G. Saggiorato, H. Treichel, A.J. Cichoski, V. Astolfi, R.I. Cardoso, G. Toniazzo, E. Valduga, N. Paroul & R.L. Cansian, Antibacterial activity of basil essential oil (*Ocimum basilicum* L.) in Italian-type sausage, *Journal für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit*, 10(4) (2015) 323-329.
- [32] A. A. F. Zielinski, C. W. I. Haminiuk, C. A. Nunes, E. Schnitzler, S. M. Van Ruth & D. Granato, Chemical composition, sensory properties, provenance, and bioactivity of fruti juices as assessed by chemometrics: A critical review and guideline, *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 13(3) (2014) 300–316.
- [33] A. Sila, O. M. Alvarez, A. Haddar, F. Frikha, P. Dhulster, N. Nedjar-Arroume & A. Bougatef, Purification, identification and structural modelling of DPP-IV inhibiting peptides from barbel protein hydrolysate, *Journal of Chromatography B*, 1008 (2016) 260–269.
- [34] A.A. Karim & R. Bhat, Gelatin alternatives for the food industry: recent developments, challenges and prospects, *Trends in Food Science & Technology*, 19 (2008) 644-656.
- [35] J. Kong, & S. Yu, Fourier transform infrared spectroscopic analysis of protein secondary structures, *Acta Biochimica et Biophysica Sinica*, 39(8) (2007) 549–559.
- [36] X. Duan, D. Ocen, F. Wu, M. Li, N. Yang, J. Xu, H. Chen, L. Huang, Z. Jin & X. Xu, Purification and characterization of a natural antioxidant peptide from fertilized eggs, *Food Research International*, 56 (2014) 18–24,.
- [37] Z.L. Yu, W.C. Zeng, W.H. Zhang, X.P. Liao & B. Shi, Effect of ultrasound on the activity and conformation of  $\alpha$ -amylase, papain and pepsin, *Ultrasonics Sonochemistry*, 21(3) (2014) 930–936.
- [38] Z. Yu, W. Zeng & X. Lu, Influence of ultrasound to the activity of tyrosinase.

Ultrasonics Sonochemistry, 20 (2013) 805-809.

- [39] C. Arzeni, O.E. Pérez, & A.M.R. Pilosof, Functionality of egg white proteins as affected by high intensity ultrasound, *Food Hydrocolloids*, 29(2) (2012b) 308–316.
- [40] Z. Knezevic-Jugovic, A. Stefanovic, M. Zuza, S. Milovanovic, S. Jakovetic, V. Manojlovic & B. Bugarski, Effects of sonication and high-pressure carbon dioxide processing on enzymatic hydrolysis of egg white proteins, *Acta Periodica Technologica*, 43 (2012) 33–41.
- [41] F. M. Diniz & A. M. Martin, Use of response surface methodology to describe the combined effects of pH, temperature and E/S ratio on the hydrolysis of dogfish (*Squalus acanthias*) muscle, *Int. J. Food Science and Technology*, 31 (1996) 419-426.
- [42] B. Giménez, A. Alemán, P. Montero & M.C. Gómez-Guillén, Antioxidant and functional properties of gelatin hydrolysates obtained from skin of sole and squid, *Food Chemistry*, 114 (2009) 976–983.
- [43] H. G. Kristinsson & B. A. Rasco, Fish Protein Hydrolysates: Production, Biochemical, and Functional Properties, *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 40(1) (2000) 43-81.
- [44] S. Kangsanant, M. Murkovic & C. Thongraung, Antioxidant and nitric oxide inhibitory activities of tilapia (*Oreochromis niloticus*) protein hydrolysate: Effect of ultrasonic pretreatment and ultrasonic-assisted enzymatic hydrolysis, *International Journal of Food Science and Technology*, 49(8) (2014) 1932–1938.
- [45] B.H. Sarmadi & A. Ismail, Antioxidative peptides from food proteins: A review. *Peptides*, 31(10) (2010) 1949–1956.
- [46] K.-C. Hsu, Purification of antioxidant peptides prepared from enzymatic hydrolysates of tuna dark muscle by-product. *Food Chemistry*, 122 (2010) 42–48.
- [47] N. Rajapakse, E. Mendis, H.-G. Byun & S.-K. Kim, Purification and in vitro antioxidative effects of giant squid muscle peptides on free radical-mediated oxidative systems, *Journal of Nutrition and Biochemistry*, 16 (2005) 562–569.
- [48] N. Rajapakse, E. Mendis, W.K. Jung, J.Y. Je & S.K. Kim, Purification of a radical scavenging peptide from fermented mussel sauce and its antioxidative properties, *Food Research International*, 38 (2005) 175–182.
- [49] J. Wang, K. Wang, S. Lin, P. Zhao, G. Jones, H. Trang, J. Liu & H. Ye, Improvement of antioxidant activity of peptides with molecular weights ranging from 1 to 10 kDa by PEF technology, *International Journal of Biological Macromolecules*, 51(2012) 244–249.

- [50] M. Rocha, M.R. Loiko, E.C. Tondo & C. Prentice-Hernández, Physical, mechanical and antimicrobial properties of Argentine anchovy (*Engraulis anchoita*) protein films incorporated with organic acids, *Food Hydrocolloids*, 37 (2014) 213–220.
- [51] B. D. G. M. Franco & M. Landgraf, *Microbiologia dos alimentos*, Atheneu, São Paulo, 2008.
- [52] H.O. Almeida, Identificação de peptídeos antimicrobianos de folhas de berinjela para o controle de patógenos de plantas, Dissertação de Mestrado, Programa de Pós-Graduação em Bioquímica Agrícola da Universidade Federal de Viçosa, Brasil, 128p (2007) (resultados não publicados).

**Tabela 1** – Diferentes tipos de colágenos bovinos utilizados para obtenção de hidrolisados proteicos.

<b>Tipo de colágeno</b>	<b>Nome/Sigla</b>	<b>Fabricante</b>	<b>Descrição</b>
Fibra natural	Fibra/FB	Novaprom Food Ingredients Ltda (Lins – SP - Brasil)	Tamanho de partícula entre 1,80 e 1,92 mm, extraída de pele bovina por tratamento alcalino, pH entre 7 e 9,5
Fibra em pó	Fibra pó/FP	Novaprom Food Ingredients Ltda (Lins – SP- Brasil)	Tamanho de partícula entre 0,45 e 0,57 mm, extraída de pele bovina por tratamento alcalino, pH entre 7 e 9,5
Gelatina 1	Gelita <sup>®</sup> /GEL	Gelita do Brasil Ltda (Cotia – SP- Brasil)	Extraída de couro ou de diversas matérias-primas por hidrólise parcial alcalina (tratamento drástico), 236 g de Bloom; 40 mP de viscosidade; 11% de umidade; pH 5,6; <= 2% de cinzas
Gelatina 2	Rousselot <sup>®</sup> /ROU	Rousselot Gelatinas do Brasil Ltda (Amparo – SP- Brasil)	Extraída de couro ou de diversas matérias-primas por hidrólise parcial alcalina (tratamento drástico), 250g de Bloom; 3,8 mP de viscosidade; 12,4% de umidade; pH 5,5; <=2% de cinzas
Hidrolisado 1	Peptiplus <sup>®</sup> /PTL	Gelita do Brasil Ltda (Cotia – SP- Brasil)	Extraído de couro bovino/ pele suína por hidrólise química + enzimática, 39 mP de viscosidade; 5,9% de umidade; 92,1% de proteínas; pH 5,7; <=2% de cinzas
Hidrolisado 2	Peptan B <sup>®</sup> /PEP	Rousselot Gelatinas do Brasil Ltda (Amparo – SP- Brasil)	Extraído de couro bovino/ pele suína por hidrólise química + enzimática, 4 mP de viscosidade; 7,2% de umidade; 92,15% de proteína; pH 6; 0,65% de cinzas

Fonte: [21-23].

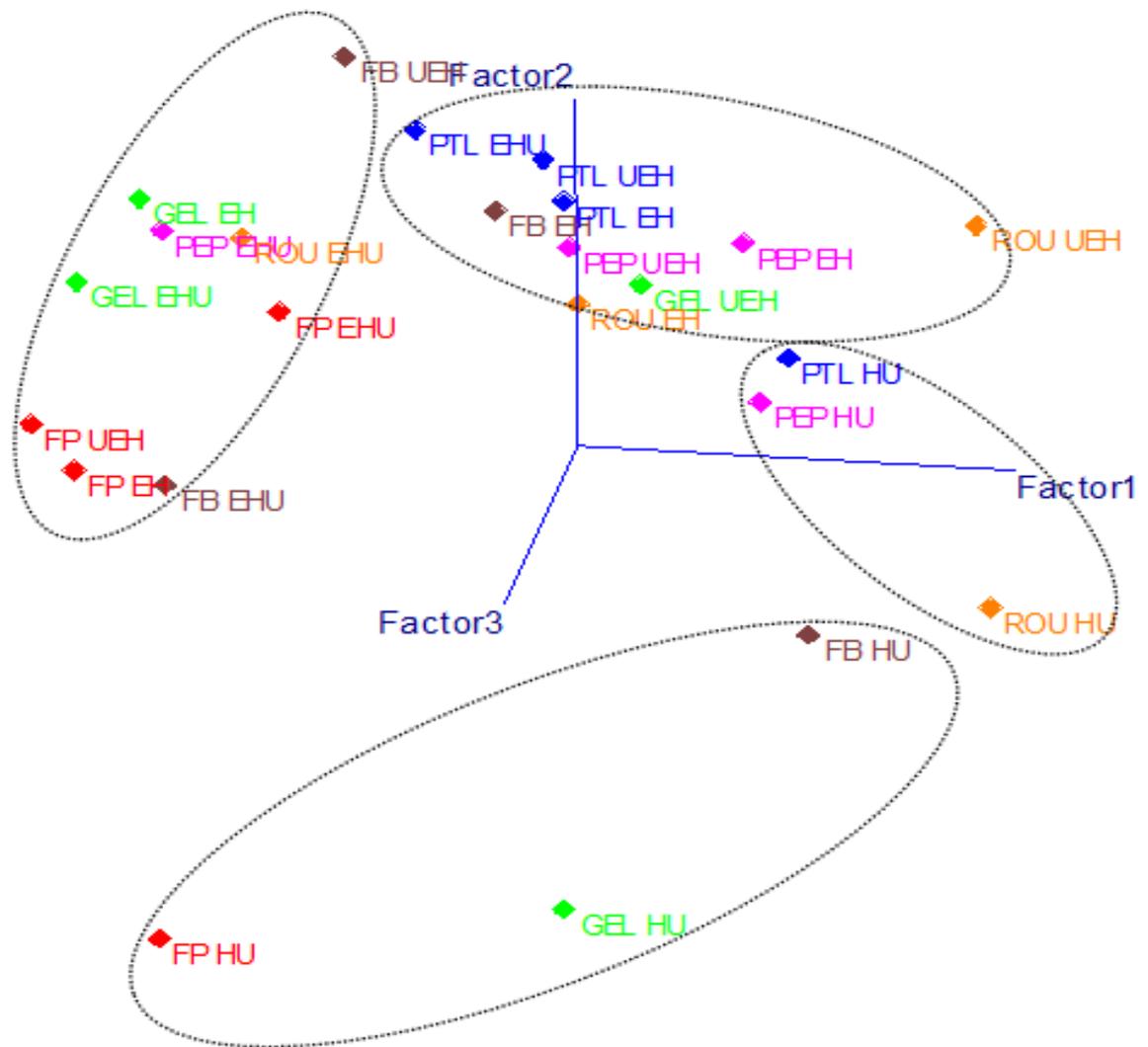
**Tabela 2** – Tratamentos utilizados para obtenção dos hidrolisados proteicos de colágeno bovino.

<b>Sigla</b>	<b>Descrição dos tratamentos</b>
CC	Colágenos brutos
HU	Hidrólise por ultrassom
EH	Hidrólise enzimática
EHU	Hidrólise enzimática assistida por ultrassom
UEH	Tratados previamente com ultrassom e posterior hidrólise enzimática

**Tabela 3** – Teores médios de umidade, cinzas, proteínas, lipídios, pH, hidroxiprolina e colágeno para os diferentes tipos de colágeno.

<b>Tipo de colágeno*</b>	<b>Umidade (%)</b>	<b>Cinzas (%)</b>	<b>Proteínas (%)</b>	<b>Lipídios (%)</b>	<b>pH</b>	<b>Hidroxiprolina g/100 g**</b>	<b>Colágeno g/100 g</b>
<b>FB</b>	0,96 <sup>b</sup> ±0,39	1,24 <sup>b</sup> ±0,77	87,7 <sup>b</sup> ±0,43	3,37 <sup>a</sup> ±0,01	6,72 <sup>a</sup> ±0,02	10,8 <sup>b</sup> ±0,06	86,3 <sup>b</sup> ±0,51
<b>FP</b>	3,51 <sup>ab</sup> ±0,12	3,20 <sup>a</sup> ±2,29	84,4 <sup>c</sup> ±0,85	3,14 <sup>b</sup> ±0,06	6,26 <sup>c</sup> ±0,02	11,3 <sup>b</sup> ±0,16	90,6 <sup>b</sup> ±1,24
<b>PEP</b>	7,59 <sup>ab</sup> ±0,09	0,72 <sup>b</sup> ±0,28	87,3 <sup>b</sup> ±0,28	0,53 <sup>c</sup> ±0,03	6,46 <sup>b</sup> ±0,01	11,4 <sup>b</sup> ±0,28	91,2 <sup>b</sup> ±2,26
<b>PTL</b>	5,51 <sup>ab</sup> ±0,51	0,57 <sup>b</sup> ±0,21	91,0 <sup>a</sup> ±0,29	0,58 <sup>c</sup> ±0,01	5,62 <sup>d</sup> ±0,02	12,9 <sup>a</sup> ±0,04	100,0 <sup>a</sup> ±0,34
<b>GEL</b>	10,6 <sup>a</sup> ±0,09	0,56 <sup>b</sup> ±0,22	86,3 <sup>bc</sup> ±0,54	0,53 <sup>c</sup> ±0,01	5,60 <sup>d</sup> ±0,03	12,9 <sup>a</sup> ±0,14	100,0 <sup>a</sup> ±1,13
<b>ROU</b>	10,6 <sup>a</sup> ±5,09	0,61 <sup>b</sup> ±0,13	86,3 <sup>bc</sup> ±0,80	0,54 <sup>c</sup> ±0,03	5,35 <sup>e</sup> ±0,02	11,4 <sup>b</sup> ±0,15	91,2 <sup>b</sup> ±1,19

Médias seguidas por letras minúsculas distintas na mesma linha diferem ( $p < 0,05$ ) entre si pelo teste de Tukey. \*FB – fibra natural de colágeno; FP – fibra de colágeno em pó; PTL – colágeno hidrolisado 1; PEP – colágeno hidrolisado 2; GEL – gelatina 1; ROU – gelatina 2. \*\*Valores informados pelas indústrias fabricantes das amostras.



**Fig. 1** Dispersão tridimensional da parcela obtida pela PCA com base na região 500-1722  $\text{cm}^{-1}$ .

FB – fibra natural de colágeno; FP – fibra de colágeno em pó; PTL – colágeno hidrolisado 1; PEP – colágeno hidrolisado 2; GEL – gelatina 1; ROU – gelatina 2. HU – hidrólise por ultrassom; EH – hidrólise enzimática; EHU – hidrólise enzimática assistida por ultrassom; UEH – tratados previamente com ultrassom e posterior hidrólise enzimática.

**Tabela 4** - Valores probabilísticos para avaliar o efeito do ultrassom prévio ou concomitante a aplicação da enzima Alcalase<sup>®</sup> sobre as variáveis proteínas (mg/mL), grau de hidrólise (%), e atividade antioxidante (%).

<b>Efeitos</b>	<b>ptn</b>	<b>GH</b>	<b>AA</b>
<b>Colágeno</b>	0,0001	0,0001	0,0001
<b>Enzima</b>	0,0001	0,0001	0,0001
<b>Ultrassom</b>	0,1075	0,0001	0,0090
<b>Enzima × Ultrassom</b>	0,0001	0,0001	0,0001
<b>Colágeno × Enzima</b>	0,0001	0,0001	0,0001
<b>Colágeno × Ultrassom</b>	0,0001	0,0001	0,0001
<b>Colágeno × Enzima × Ultrassom</b>	0,0001	0,0294	0,0001
<b>Média</b>	7,79	4,42	44,8
<b>CV</b>	1,35	0,57	14,9

ptn – proteína; GH – grau de hidrólise e AA – atividade antioxidante. CV (%) – coeficiente de variação.

**Tabela 5** - Coeficientes da correlação de Spearman entre as variáveis proteína (mg/mL), grau de hidrólise (%) e atividade antioxidante (%) dos hidrolisados de colágeno.

	<b>ptn</b>	<b>GH</b>	<b>AA</b>
<b>ptn</b>		-0,73***	-0,15 <sup>ns</sup>
<b>GH</b>			0,13 <sup>ns</sup>
<b>AA</b>			

ptn – proteína; GH – grau de hidrólise e AA – atividade antioxidante. <sup>ns</sup>Não significativo (p>0,05); \*Significativo (p<0,05); \*\*Significativo (p<0,01); \*\*\*Significativo (p<0,001).

**Tabela 6** – Resultados médios de proteína, grau de hidrólise e atividade antioxidante para as amostras de hidrolisados de colágeno, avaliando a interação enzima vs. ultrassom.

	Enzima, %	Ultrassom		Média enzima
		Prévio	Concomitante	
<b>ptn, mg/mL</b>	8	8,07 <sup>aA</sup>	7,85 <sup>b</sup>	7,96
	16	7,68 <sup>bB</sup>	7,82 <sup>a</sup>	7,75
<b>Média ultrassom</b>		7,88	7,84	
<b>GH, %</b>	8	3,43 <sup>B</sup>	3,69 <sup>B</sup>	3,56
	16	6,23 <sup>aA</sup>	4,62 <sup>bA</sup>	5,42
<b>Média ultrassom</b>		4,83	4,15	
<b>AA, %</b>	8	30,7 <sup>bB</sup>	47,6 <sup>a</sup>	39,1
	16	52,9 <sup>aA</sup>	45,1 <sup>b</sup>	49,0
<b>Média ultrassom</b>		41,8	46,3	

ptn – proteína; GH – grau de hidrólise e AA – atividade antioxidante. Médias seguidas por letras minúsculas distintas na mesma linha diferem ( $p < 0,05$ ) entre ultrassom pelo teste “t”. Médias seguidas por letras maiúsculas distintas na mesma coluna diferem ( $p < 0,05$ ) entre enzima pelo teste “t”.

**Tabela 7** - Valores probabilísticos para avaliação do efeito do ultrassom (sem ou com), da enzima (0, 8 e 16%) e dos diferentes tipos de colágeno sobre as variáveis proteína (mg/mL), grau de hidrólise (%) e atividade antioxidante (%).

<b>Efeitos</b>	<b>ptn</b>	<b>GH</b>	<b>AA</b>
<b>Colágeno</b>	0,0001	0,0001	0,0001
<b>Enzima</b>	0,0001	0,0001	0,0001
<b>Ultrassom</b>	0,1299	0,0002	0,6347
<b>Enzima × Ultrassom</b>	0,0001	0,0001	0,0726
<b>Colágeno × Enzima</b>	0,0001	0,0001	0,0001
<b>Colágeno × Ultrassom</b>	0,0001	0,0004	0,0095
<b>Colágeno × Enzima × Ultrassom</b>	0,0001	0,0001	0,0002
<b>Média</b>	7,88	3,10	36,9
<b>CV</b>	2,12	1,40	26,6

ptn – proteína; GH – grau de hidrólise e AA – atividade antioxidante. CV (%) – coeficiente de variação.

**Tabela 8** - Coeficientes da correlação de Spearman entre as variáveis proteína (mg/mL), grau de hidrólise (%) e atividade antioxidante (%) dos hidrolisados de colágeno.

	<b>ptn</b>	<b>GH</b>	<b>AA</b>
<b>ptn</b>		-0,73***	-0,45***
<b>GH</b>			0,54***
<b>AA</b>			

ptn – proteína; GH – grau de hidrólise e AA – atividade antioxidante. <sup>n</sup>Não significativo (p>0,05); \*Significativo (p<0,05); \*\*Significativo (p<0,01); \*\*\*Significativo (p<0,001).

**Tabela 9** – Resultados médios de proteína, grau de hidrólise e atividade antioxidante para as diferentes amostras de hidrolisados de colágeno.

Colágeno**	Enzima, %	US prévio*		Média enzima	Média colágeno	US prévio*		Média enzima	Média colágeno	US prévio*		Média enzima	Média colágeno
		Sem	Com			Sem	Com			Sem	Com		
<b>Proteína, mg/ml</b>													
FB	0	8,21 <sup>aAB</sup>	7,62 <sup>bC</sup>	7,92	8,06 <sup>B</sup>	0,00 <sup>bB</sup>	8,27 <sup>aA</sup>	4,1	2,37 <sup>B</sup>	7,13 <sup>B</sup>	10,5 <sup>B</sup>	8,83	32,1 <sup>AB</sup>
	8	7,97 <sup>B</sup>	7,96 <sup>B</sup>	7,96		2,92 <sup>A</sup>	3,06 <sup>B</sup>	2,99		53,5 <sup>A</sup>	41,7 <sup>A</sup>	47,6	
	16	8,37 <sup>A</sup>	8,28 <sup>A</sup>	8,32		0,00 <sup>B</sup>	0,00 <sup>C</sup>	0,00		56,1 <sup>aA</sup>	23,3 <sup>bB</sup>	39,7	
	Média ultrassom	8,18	7,95			0,97	3,75			38,9	25,2		
FP	0	8,79 <sup>bA</sup>	9,58 <sup>aB</sup>	9,21	8,94 <sup>A</sup>	0,00 <sup>C</sup>	0,62 <sup>B</sup>	0,31	2,63 <sup>B</sup>	21,7 <sup>B</sup>	12,9 <sup>B</sup>	17,3	28,5 <sup>B</sup>
	8	8,16 <sup>bC</sup>	10,2 <sup>aA</sup>	9,17		7,18 <sup>aA</sup>	0,00 <sup>bB</sup>	3,59		43,2 <sup>aA</sup>	25,3 <sup>bAB</sup>	34,2	
	16	8,51 <sup>B</sup>	8,38 <sup>C</sup>	8,44		3,27 <sup>B</sup>	4,73 <sup>A</sup>	4,00		28,2 <sup>AB</sup>	39,7 <sup>A</sup>	33,9	
	Média ultrassom	8,49	9,40			3,48	1,78			31,0	25,9		
PEP	0	8,02 <sup>A</sup>	7,93 <sup>A</sup>	7,98	7,81 <sup>C</sup>	0,00 <sup>C</sup>	1,36 <sup>C</sup>	0,68	4,36 <sup>A</sup>	37,3 <sup>AB</sup>	31,0 <sup>B</sup>	34,1	41,6 <sup>AB</sup>
	8	7,81 <sup>A</sup>	7,73 <sup>A</sup>	7,77		2,74 <sup>B</sup>	3,77 <sup>B</sup>	3,26		35,1 <sup>B</sup>	34,3 <sup>B</sup>	34,7	
	16	7,38 <sup>B</sup>	7,20 <sup>B</sup>	7,29		8,00 <sup>A</sup>	10,3 <sup>A</sup>	9,15		52,9 <sup>A</sup>	59,1 <sup>A</sup>	56,0	
	Média ultrassom	7,74	7,62			3,58	5,14			41,8	41,5		
PTL	0	7,80 <sup>A</sup>	7,80 <sup>A</sup>	7,80	7,68 <sup>C</sup>	0,00 <sup>B</sup>	1,34 <sup>B</sup>	0,67	4,78 <sup>A</sup>	16,6 <sup>bB</sup>	39,3 <sup>aB</sup>	27,9	43,6 <sup>A</sup>
	8	7,31 <sup>bB</sup>	7,61 <sup>aA</sup>	7,46		6,76 <sup>aA</sup>	3,39 <sup>bB</sup>	5,08		55,2 <sup>aA</sup>	25,4 <sup>bB</sup>	40,3	
	16	7,27 <sup>B</sup>	7,06 <sup>B</sup>	7,17		7,19 <sup>bA</sup>	9,99 <sup>aA</sup>	8,59		59,9 <sup>A</sup>	64,9 <sup>A</sup>	62,4	
	Média ultrassom	7,46	7,49			4,65	4,90			43,9	43,2		
GEL	0	7,98 <sup>A</sup>	7,80	7,89	7,48 <sup>D</sup>	0,00 <sup>bB</sup>	2,85 <sup>a</sup>	1,42	2,36 <sup>B</sup>	15,0 <sup>B</sup>	18,4 <sup>B</sup>	16,7	39,6 <sup>AB</sup>
	8	8,01 <sup>aA</sup>	7,63 <sup>b</sup>	7,82		0,00 <sup>bB</sup>	4,36 <sup>a</sup>	2,18		43,0 <sup>A</sup>	37,1 <sup>B</sup>	40,0	
	16	7,69 <sup>B</sup>	7,73	7,71		3,73 <sup>A</sup>	3,23	3,48		58,0 <sup>A</sup>	66,2 <sup>A</sup>	62,1	
	Média ultrassom	7,89	7,72			1,24	3,48			38,6	40,6		
ROU	0	7,89 <sup>A</sup>	7,73 <sup>A</sup>	7,81	7,69 <sup>C</sup>	0,00 <sup>bB</sup>	2,82 <sup>aB</sup>	1,41	2,67 <sup>B</sup>	19,1 <sup>B</sup>	15,4 <sup>C</sup>	17,2	36,1 <sup>AB</sup>
	8	7,83 <sup>A</sup>	7,72 <sup>A</sup>	7,78		0,82 <sup>B</sup>	2,16 <sup>B</sup>	1,49		26,2 <sup>bB</sup>	47,0 <sup>aB</sup>	36,6	
	16	7,53 <sup>B</sup>	7,44 <sup>B</sup>	7,49		4,57 <sup>A</sup>	5,67 <sup>A</sup>	5,12		44,6 <sup>bA</sup>	64,3 <sup>aA</sup>	54,4	
	Média ultrassom	7,75	7,63			1,80	3,55			29,9	42,2		
Média geral ultrassom		7,92	7,97				2,62	3,77		37,4	36,4		

\*\*FB – fibra de colágeno; FP – fibra de colágeno em pó; PTL – colágeno hidrolisado 1; PEP – colágeno hidrolisado 2; GEL - gelatina 1; ROU - gelatina 2. Médias seguidas por letras minúsculas distintas na mesma linha diferem ( $p < 0,05$ ) entre ultrassom pelo teste “t”. Médias seguidas por letras maiúsculas distintas na mesma coluna diferem ( $p < 0,05$ ) entre enzima ou colágeno pelo teste “t”.

### III. CAPÍTULO

#### 5. ARTIGO II

(Artigo formatado de acordo com a revista Ultrasonic Sonochemistry)

**Propriedades funcionais e estruturais de hidrolisados de diferentes colágenos bovinos obtidos através da hidrólise enzimática (Flavourzyme<sup>®</sup>) assistida por ultrassom**

**Propriedades funcionais e estruturais de hidrolisados de diferentes colágenos bovinos obtidos através da hidrólise enzimática (Flavourzyme<sup>®</sup>) assistida por ultrassom**

**RESUMO**

Este estudo teve por objetivo avaliar as propriedades funcionais e estruturais de hidrolisados de diferentes colágenos bovinos obtidos através da hidrólise enzimática (Flavourzyme<sup>®</sup>) assistida por ultrassom. Foram avaliadas as características estruturais (espectroscopia na região do infravermelho com Transformada de Fourier), grau de hidrólise, atividade antioxidante e atividade antimicrobiana dos hidrolisados. A utilização do ultrassom prévio ou concomitante potencializou a hidrólise enzimática das amostras, gerando maior quantidade de bandas em número de onda ( $\text{cm}^{-1}$ ). A amostra hidrolisado 1 foi a que apresentou menor média geral de grau de hidrólise (13,7%), porém foi a que apresentou maior média geral de atividade antioxidante (43,6%), enquanto o hidrolisado da amostra fibra pó foi o que apresentou menor média geral de atividade antioxidante, de 20,9%. Os hidrolisados das amostras fibra, gelatina 1 e gelatina 2 apresentaram valores médios gerais de atividade antioxidante semelhantes, 28,6, 29,4 e 29,0%, respectivamente. Para as amostras fibra, hidrolisado 1, gelatina 1 e gelatina 2, analisando apenas a funcionalidade dos hidrolisados gerados, o melhor tratamento foi a hidrólise enzimática, enquanto para fibra pó e hidrolisado 2 foi a hidrólise por ultrassom. A menor concentração inibitória das bactérias *Salmonella choleraesuis* e *Staphylococcus aureus* encontrada para alguns hidrolisados foi de 10%. A utilização da enzima Flavourzyme<sup>®</sup> e do ultrassom no processo de hidrólise beneficiaram a atividade antimicrobiana dos hidrolisados, o que pode ser explicado pelo favorecimento da ligação do peptídeo com a membrana celular bacteriana, inibindo o crescimento de microrganismos. Diante disso, pode-se concluir que a hidrólise enzimática (Flavourzyme<sup>®</sup>) possibilitou a hidrólise das amostras, proporcionando rompimento estrutural e maior funcionalidade aos hidrolisados de diferentes colágenos bovinos.

**Palavras-chave:** Flavourzyme<sup>®</sup>, atividade antioxidante, atividade antimicrobiana, FTIR, grau de hidrólise, ultrassom.

## 1. INTRODUÇÃO

Os colágenos podem ser encontrados em todos os tecidos conjuntivos de organismos multicelulares, principalmente em tendões, cartilagens, ligamentos, músculos, ossos desmineralizados, sistema vascular e outros órgãos de vertebrados, compreendendo uma grande e diversificada família de proteínas [1], sendo esta a proteína de origem animal mais encontrada, representando aproximadamente 30% do total de proteínas [2]. As pesquisas que envolveram a obtenção, fracionamento e caracterização dos hidrolisados e peptídeos de colágeno [3] focaram nas propriedades funcionais destes compostos. A hidrólise enzimática através de proteases animais ou vegetais [4-6] aplicada a subprodutos do abate de bovinos possibilita a obtenção de peptídeos derivados do colágeno, agregando valor a esses resíduos [4, 7].

A especificidade, o controle do grau de hidrólise, as condições moderadas de ação e o menor conteúdo de sal no hidrolisado final são algumas das vantagens da utilização de proteases específicas na hidrólise de colágenos. Não obstante, as enzimas podem ser usadas em menores quantidades e não necessitam de remoção ao final do processo [8]. Para aumentar as propriedades funcionais das proteínas através da modificação estrutural é feita a hidrólise enzimática, devido esta possuir a capacidade de modificar uma variedade de grupos funcionais [9, 10]. A enzima Flavourzyme<sup>®</sup> tem sido bastante usada para obtenção de hidrolisados protéicos com propriedades funcionais [11]. Ela pode atuar sob condições neutras ou ligeiramente ácidas de hidrólise, se tratando de uma protease fúngica complexa, a qual é oriunda da fermentação submersa de uma linhagem específica de *Aspergillus oryzae* sem modificação genética [12].

Estudos relatam que os peptídeos de colágeno podem apresentar atividade antimicrobiana, antioxidante e anti-hipertensiva [13-15]. Esses peptídeos bioativos são definidos como uma sequência de aminoácidos inativos quando presentes no interior da molécula de proteína, passando a exercerem determinadas atividades biológicas a partir do momento em que são liberados através da hidrólise química e/ou enzimática. Geralmente são peptídeos com 3 a 20 aminoácidos, liberados no processo de industrialização de alimentos ou ainda durante a digestão gastrointestinal [3, 7].

O ultrassom está sendo muito utilizado para modificar a estrutura e as propriedades funcionais das proteínas alimentares [16-19], principalmente de proteínas de origem animal [20, 21]. Isso se deve a capacidade do mesmo em causar modificações nas proteínas e na atividade enzimática, melhorando a ligação substrato-enzima e exposição do sítio ativo da enzima, proporcionando assim, o aumento da atividade. A utilização do ultrassom como pré-

tratamento ou concomitante ao processo de hidrólise provoca o rompimento de estruturas terciárias e quaternárias das proteínas, isso é provocado pelos efeitos da cavitação no meio, conseqüentemente essas alterações estruturais facilitam o acesso da enzima a estrutura protéica, provocando o aumento da hidrólise e da bioatividade [22]. Entretanto, a aplicação do ultrassom no processo enzimático pode causar efeitos adversos à conformação da enzima e a sua atuação no processo de hidrólise.

As diferenças entre os diversos tipos de subprodutos de colágeno (gelatina, fibra e colágeno hidrolisado) e a avaliação dos efeitos da hidrólise enzimática com a enzima Flavourzyme<sup>®</sup> assistida por ultrassom sobre as propriedades funcionais e estruturais dos hidrolisados proteicos ainda foi pouco explorada, o que permite um amplo campo a ser estudado. O objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito da hidrólise enzimática (Flavourzyme<sup>®</sup>) assistida por ultrassom nas propriedades funcionais e estruturais de hidrolisados de diferentes colágenos bovinos.

## 2. MATERIAIS E MÉTODOS

Para obtenção dos hidrolisados proteicos foram utilizados diferentes colágenos bovinos, os quais estão apresentados na **Tabela 1**. A Flavourzyme 1000L<sup>®</sup> (Novozymes<sup>®</sup>) foi fornecida pela empresa Tovanni Benzaquen Ingredientes (São Paulo, SP, Brasil) e os demais reagentes de grau analítico (PA) foram adquiridos da empresa Sigma-Aldrich Brasil Ltda (São Paulo, SP, Brasil).

### 2.1 Tratamentos de hidrólise

Foram realizados diferentes tratamentos para obtenção dos hidrolisados protéicos de colágeno bovino, os quais podem ser evidenciados na **Tabela 2**.

As reações enzimáticas foram conduzidas seguindo a metodologia utilizada por Schmidt & Salas-Mellado [26] com algumas modificações, foi utilizado 8% de enzima em relação ao substrato. Nas reações de hidrólise foram utilizados os seguintes equipamentos: banho ultratermostático (Modelo SL152, potência de 2000 W, SOLAB, Piracicaba, SP, Brasil), banho ultrassônico (Modelo ECO-SONICS – Q3.8/40A, potência de 88 W e frequência de 40 KHz, ULTRONIQUE, SERVYLAB, São Leopoldo, RS, Brasil) e centrífuga COLEMAN (Modelo 90 – 1, Santo André, SP, Brasil). Os hidrolisados foram liofilizados (liofilizador TERRONI, Modelo LS3000, São Carlos, SP, Brasil). Para o tratamento EHU o tempo total de processo de hidrólise foi de 2 horas, já para o tratamento UEH foi de 4 horas.

## 2.2 Caracterização estrutural dos hidrolisados

A análise de FTIR foi realizada de acordo com a metodologia descrita por Demiate *et al.* [27]. Para análise foi utilizado espectrofotômetro no infravermelho com transformada de Fourier (FTIR) Shimadzu IR-21 Prestige (Shimadzu Corporation, Kyoto, Japão). Os espectros foram recolhidos na faixa de 4.000 - 400  $\text{cm}^{-1}$ . As pastilhas foram produzidas através da mistura de 100 mg de KBr e 2 mg de amostra liofilizada, sendo prensados em uma prensa hidráulica Carver.

## 2.3 Determinação do grau de hidrólise dos hidrolisados

Para determinação do grau de hidrólise utilizou-se o método Lowry *et al.* [28]. Como padrão para o método foi utilizada a albumina bovina (Sigma-Aldrich Brasil Ltda, São Paulo, SP, Brasil). Com base na quantidade de proteína dos colágenos brutos foi calculado o grau de hidrólise.

## 2.4 Determinação da atividade antioxidante dos hidrolisados

O método DPPH de Brand-Willians *et al.* [29] modificado por Sánchez-Moreno *et al.* [30] foi utilizado para avaliar a atividade antioxidante dos hidrolisados. Para análise foi utilizado o equipamento espectrofotômetro UV (Modelo UV – M51, BEL Photonics, SERVYLAB, São Leopoldo, RS, Brasil).

## 2.5 Determinação da atividade antimicrobiana dos hidrolisados

A Concentração Inibitória Mínima (CIM) foi determinada pelo método indireto de crescimento bacteriano em meio de cultura líquido [31]. A determinação da CIM foi realizada sobre bactéria Gram-negativa (*Salmonella choleraesuis* - ATTC 10708) e Gram-positiva (*Staphylococcus aureus* - ATTC 6538), as quais foram previamente crescidas em caldo Luria Bertani (10 g/L tripton, 5 g/L extrato de levedura, 5 g/L NaCl) a 37 °C por 24 horas.

Após o período de crescimento das culturas, foram inoculadas, em micro placas de fundo chato, 10  $\mu\text{L}$  de pré-inóculo de cada bactéria ( $10^8$  UFC.mL<sup>-1</sup>) em um volume final de 300  $\mu\text{L}$  de caldo LB com as diferentes concentrações das formulações de hidrolisados de colágeno previamente diluídas (15 a 30%). Posteriormente, as micro-placas foram incubadas a 35 °C por 24 horas em agitador eletromagnético (60 Hz). Antes e após o período de incubação, 0 e 24 horas respectivamente, realizou-se a leitura da micro placa, utilizando-se o leitor automático de micro placas (Bio-TecInstruments Inc., modelo EL800), com comprimento de onda pré-selecionado de 490 nm.

A Concentração Inibitória Mínima foi determinada como a menor concentração de hidrolisado de colágeno que não gerou alteração na turbidez, obtida pela diferença entre as leituras realizadas em 24 e 0 horas.

## 2.6 Avaliação estatística

Os espectros de FTIR, depois de coletados, foram suavizados (15 pontos), a linha de base foi corrigida, a zona de CO<sub>2</sub> removida e os dados foram normalizados usando o software Shimadzu IRsolution 1.40. Em seguida, uma tabela com todos os dados foi construída, utilizando o número de onda nas colunas e as amostras nas linhas.

Uma abordagem quimiométrica, incluindo a análise de componentes principais (PCA), foi implementada no Pirouette v. 4.0 (Infometrix<sup>®</sup>, Bothell, WA, EUA). A análise foi realizada na região do espectro compreendendo de 500 a 1722 centímetros<sup>-1</sup>, e o conjunto de dados foi centrado na média e submetido à primeira derivada.

A PCA é uma técnica de redução de dados, a qual foi aplicada para verificar diferenças entre as amostras e extrair informações importantes dos espectros da FTIR. Foi construído um gráfico de dispersão tridimensional para projetar as amostras [32].

Foram realizados dois experimentos para avaliação estatística dos dados de proteína (Lowry), grau de hidrólise (Lowry) e atividade antioxidante (DPPH):

O Experimento 1 avaliou qual aplicação do ultrassom, previamente ou concomitante, foi melhor ao tratamento enzimático. Efetuou-se análise do experimento em parcelas subdivididas (*split plot*) com delineamento inteiramente casualizado, sendo os diferentes colágenos distribuídos nas parcelas e a aplicação de ultrassom (prévio vs. concomitante) e suas interações distribuídas ao acaso nas subparcelas dentro de cada parcela, conforme o modelo estatístico (Eq. 1):

$$Y_{ijk} = \mu + \alpha_i + (\alpha\gamma)_{ik} + \beta_j + (\alpha\beta)_{ij} + \varepsilon_{ijk} \quad [1]$$

em que,  $Y_{ijk}$  = valor observado na  $i$ -ésima parcela,  $k$ -ésima repetição e  $j$ -ésima subparcela;  $\mu$  = média geral da variável resposta;  $\alpha_i$  = efeito fixo do  $i$ -ésimo colágeno;  $(\alpha\gamma)_{ik}$  = efeito residual das parcelas (erro A);  $\beta_j$  = efeito fixo da  $j$ -ésima aplicação do ultrassom;  $(\alpha\beta)_{ij}$  = efeito fixo da interação entre o  $i$ -ésimo colágeno e a  $j$ -ésima aplicação do ultrassom;  $\varepsilon_{ijk}$  = efeito residual das subparcelas (erro B) ou efeito aleatório associado a  $ijk$ -ésima observação, suposto  $\varepsilon_{ijk} \stackrel{iid}{\sim} N(0, \sigma^2)$ .

O Experimento 2 avaliou o efeito do colágeno, da concentração enzimática e da

aplicação ou não de ultrassom concomitante. Efetuou-se análise do experimento em parcelas subdivididas (*split plot*) com delineamento inteiramente casualizado, sendo os diferentes colágenos distribuídos nas parcelas e as concentrações de enzimas (0 e 8%) e aplicação ou não de ultrassom (sem US vs. com US concomitante) e suas interações distribuídas ao acaso nas subparcelas dentro de cada parcela, conforme o modelo estatístico descrito na Eq. 2:

$$Y_{ijkl} = \mu + \alpha_i + (\alpha\delta)_{il} + \beta_j + \gamma_k + (\beta\gamma)_{jk} + (\alpha\beta)_{ij} + (\alpha\gamma)_{ik} + (\alpha\beta\gamma)_{ijk} + \varepsilon_{ijkl} \quad [2]$$

em que,  $Y_{ijkl}$  = valor observado na  $i$ -ésima parcela,  $l$ -ésima repetição e  $jk$ -ésima subparcela;  $\mu$  = média geral da variável resposta;  $\alpha_i$  = efeito fixo do  $i$ -ésimo colágeno;  $(\alpha\delta)_{il}$  = efeito residual das parcelas (erro A);  $\beta_j$  = efeito fixo da  $j$ -ésima concentração enzimática;  $\gamma_k$  = efeito fixo da  $k$ -ésima aplicação do ultrassom;  $(\beta\gamma)_{jk}$  = efeito fixo da interação entre a  $j$ -ésima concentração enzimática e a  $k$ -ésima aplicação do ultrassom;  $(\alpha\beta)_{ij}$  = efeito fixo da interação entre o  $i$ -ésimo colágeno e a  $j$ -ésima concentração enzimática;  $(\alpha\gamma)_{ik}$  = efeito fixo da interação entre o  $i$ -ésimo colágeno e a  $k$ -ésima aplicação do ultrassom;  $(\alpha\beta\gamma)_{ijk}$  = efeito fixo da interação entre o  $i$ -ésimo colágeno, a  $j$ -ésima concentração enzimática e  $k$ -ésima aplicação do ultrassom;  $\varepsilon_{ijkl}$  = efeito residual das subparcelas (erro B) ou efeito aleatório associado a  $ijkl$ -ésima observação, suposto  $\varepsilon_{ijkl} \stackrel{iid}{\sim} N(0, \sigma^2)$ .

Os dados foram sujeitos a investigação de *outliers* a partir dos resíduos estudentizados. Posteriormente, foram submetidos à análise de variância univariada (ANOVA) pelo procedimento GLM, suas médias ajustadas pelo método dos quadrados mínimos ordinários como comando LSMEANS e comparadas pela diferença mínima significativa (teste t) ao nível de 5% de significância. Além disso, foi realizada análise de correlação de Spearman entre as variáveis estudadas.

As análises estatísticas foram executadas no aplicativo SAS<sup>®</sup> *System for Windows*<sup>™</sup> versão 9.4 (SAS Institute Inc., Cary - NC, USA).

### 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

#### 3.1 Caracterização estrutural dos hidrolisados

A espectroscopia na região do infravermelho é amplamente utilizada para analisar estruturas secundárias de polipeptídios e proteínas [33]. De acordo com os resultados da análise de componentes principais (PCA) as amostras foram separadas em três grupos

distintos, considerando a similaridade das bandas (**Fig. 1**), explicando 92,41% da variância dos dados. Os hidrolisados GEL HU, FP HU, FB EHU, FB HU e ROU HU ficaram no mesmo grupo, agrupando-se entre o 1° e 2° quadrante, expondo que a hidrólise por ultrassom para essas amostras, com exceção da amostra FB EHU (ultrassom concomitante a hidrólise enzimática), gerou estruturas com níveis vibracionais semelhantes.

As amostras de hidrolisados ROU UEH, ROU EH, PTL EH, PTL UEH, ROU EHU e PTL HU agruparam-se entre o 2° e 3° quadrante, ficando no mesmo grupo, ou seja, essas amostras apresentaram bandas em número de onda ( $\text{cm}^{-1}$ ) semelhantes, podendo-se concluir que sofreram hidrólise em ligações específicas, gerando estruturas proteicas suscetíveis as mesmas frequências de vibrações moleculares específicas. Enquanto PEP EH, GEL UEH, FP EH, FP EHU, PTL EHU, PEP EHU, FB UEH, FB EH, PEP HU, PEP UEH FP UEH GEL EHU e GEL EH agruparam-se entre o 3° e 1° quadrante.

O hidrolisado PTL EHU foi o que apresentou menor estrutura dentre os demais hidrolisados da amostra PTL, mostrando que a hidrólise enzimática com ultrassom concomitante proporcionou a essa amostra maior ruptura estrutural, gerando menores peptídeos. Os hidrolisados da amostra PEP, para todos os tratamentos (EH, EHU, HU e UEH), se encontraram no mesmo grupo, entretanto, o hidrolisado PEP HU apresentou menor rompimento estrutural que os demais hidrolisados desta amostra, o que é justificado pelo uso apenas do ultrassom na hidrólise, o qual costuma atacar estruturas quaternárias e terciárias da proteína, e também pelo fato da amostra se tratar de um hidrolisado comercial. As amostras de FP, GEL, tratadas com UEH, EH e EHU também ficaram no mesmo grupo, apresentando semelhanças estruturais.

Li *et al.* [34] estudaram a influência do peso molecular médio em propriedades antioxidantes e funcionais de hidrolisados de colágeno da cartilagem de *Sphyrna lewini*, *Dasyatis akjei* e *Raja porosa*. As posições das bandas de FTIR para os colágenos hidrolisados foram quase inalteradas após a hidrólise. Os autores justificaram este fato pela parcial ruptura das estruturas secundárias dos hidrolisados de colágeno, provocada pela digestão de tripsina. Entretanto, foi verificado que os hidrolisados apresentaram absorbâncias integrais (a área das bandas) menores comparados as suas proteínas de origem, sugerindo que o colágeno foi hidrolisado em polipeptídios.

A utilização do ultrassom prévio ou concomitante potencializou a hidrólise enzimática das amostras, gerando maior quantidade de bandas em número de onda ( $\text{cm}^{-1}$ ). Entretanto, não se pode afirmar que foram gerados peptídeos com poder antioxidante, pois a capacidade do peptídeo gerado em capturar radicais livres é o que determina seu potencial antioxidante.

Levando em consideração os resultados obtidos pela análise de componentes principais (PCA), pode-se perceber que cada processo de hidrólise reage de forma diferente, que cada tipo de colágeno requer um tratamento de hidrólise específico, pois apresentam propriedades diferentes, decorrentes dos diferentes processos de extração, e que a enzima utilizada no processo de hidrólise atua de formas distintas dependendo das condições impostas a ela, como o pH, temperatura, relação enzima/substrato, tipo de substrato e a forma de utilização do ultrassom ao processo de hidrólise.

### 3.2 Efeito do ultrassom prévio ou concomitante ao processo de hidrólise enzimática

O efeito do colágeno foi significativo ( $p < 0,0001$ ) para as variáveis proteína (ptn), grau de hidrólise (GH) e atividade antioxidante (AA) (**Tabela 3**). O efeito do ultrassom foi significativo ( $p < 0,0001$ ) para as variáveis proteína e grau de hidrólise e não significativo ( $p > 0,05$ ) para atividade antioxidante, ou seja, o ultrassom não aumentou consideravelmente a funcionalidade dos hidrolisados. O efeito da interação colágeno x ultrassom foi significativo ( $p < 0,05$ ) para as variáveis proteína e grau de hidrólise e não significativo ( $p > 0,05$ ) para atividade antioxidante. Pode-se inferir que o ultrassom concomitante à hidrólise enzimática não favoreceu o aumento da produção de peptídeos de alta funcionalidade. Durante o processo de hidrólise a atuação da enzima pode ser prejudicada pelo efeito do ultrassom, dependendo diretamente das condições empregadas ao meio, como o tempo, pH, temperatura e intensidade de aplicação.

Como era esperado, houve correlação negativa ( $p < 0,001$ ) entre os valores de proteína (ptn) e grau de hidrólise (GH) ( $r = -0,80$ ) (**Tabela 4**). Os maiores valores de grau de hidrólise foram encontrados para aquelas amostras que apresentaram menor teor de proteína residual (após o processo de hidrólise), ou seja, quanto maior o teor de proteína residual da amostra, menor foi o grau de hidrólise. O valor do grau de hidrólise está diretamente ligado a atuação da enzima durante o processo de hidrólise, essa por sua vez, pode ser afetada de forma benéfica ou maléfica pelas condições impostas ao meio, como a quantidade de substrato, o uso do ultrassom e até mesmo a concentração da enzima.

Houve correlação negativa ( $p < 0,05$ ) entre os valores de proteína e atividade antioxidante ( $r = -0,37$ ). A quantidade de proteína presente no hidrolisado está diretamente relacionada à atividade antioxidante do mesmo, pois quanto maior o número de peptídeos com propriedades funcionais gerados pelo processo de hidrólise enzimática, maior sua atividade antioxidante.

### **3.3 Médias totais de proteína (ptn), grau de hidrólise (GH) e atividade antioxidante (AA) da avaliação do efeito do ultrassom prévio e concomitante ao processo de hidrólise enzimática**

A utilização do ultrassom concomitante ao processo de hidrólise enzimática gerou menor teor proteico, quando comparado a utilização do ultrassom previamente, conseqüentemente o valor de grau de hidrólise para o ultrassom concomitante foi maior do que do ultrassom prévio (**Tabela 5**). Entretanto, ter cuidado no processo de hidrólise é importante, pois altos valores de grau de hidrólise podem prejudicar as propriedades funcionais dos hidrolisados [11].

O ultrassom concomitante favoreceu a atuação enzimática na hidrólise, onde as amostras tratadas com o mesmo e 8% de enzima apresentaram menor teor de proteína residual gerando peptídeos com menor massa molecular, entretanto isso não significa que peptídeos com maior funcionalidade tenham sido gerados. O acesso da enzima a estrutura e a alteração da conformação das proteínas foram facilitadas pelo uso do ultrassom concomitante a hidrólise, causando o aumento do grau de hidrólise e da bioatividade dos hidrolisados, todavia essa alteração depende da natureza da proteína e do seu grau de desnaturação e agregação [19]. Yu *et al.* [35] também avaliaram a influência do ultrassom na atividade enzimática (enzima tirosinase) e os resultados encontrados mostraram o aumento da atividade da enzima, o qual foi justificado pela melhor ligação substrato-enzima e exposição do sítio ativo da enzima.

Valores baixos de proteína residual eram esperados e indicam que a enzima atuou frente às estruturas protéicas gerando frações peptídicas menores. O maior valor de atividade antioxidante foi encontrado para as amostras hidrolisadas com 8% de enzima e ultrassom concomitante. Resultado contrário foi encontrado por Knezevic-Jugovic *et al.* [36] que compararam os efeitos do ultrassom e processamento de alta pressão com dióxido de carbono sobre a hidrólise proteolítica de proteínas da clara do ovo e atividade antioxidante dos hidrolisados obtidos, os resultados encontrados por esse estudo, evidenciaram que a combinação de ultrassom como pré-tratamento (1 hora, 30 kHz, pH 8,3) e a subsequente hidrólise enzimática com alcalase (50 °C e pH 8,0) aumentou a atividade antioxidante dos hidrolisados obtidos.

A utilização do ultrassom prévio e concomitante ao processo de hidrólise enzimática das amostras proporcionou resultados semelhantes de atividade antioxidante final dos hidrolisados. Era esperado que um dos usos do ultrassom (prévio ou concomitante) potencializasse a funcionalidade dos hidrolisados. Entretanto, a não redução na atividade

antioxidante dos hidrolisados quanto a utilização de ambos os usos do ultrassom, possibilita uma maior variedade de usos deste quando o objetivo é obter hidrolisados com poder antioxidante.

Para avaliação do efeito dos diferentes tipos de colágeno, da enzima e do ultrassom sobre as diferentes variáveis analisadas foi escolhido o ultrassom concomitante como tratamento junto à enzima. O ultrassom concomitante ao processo de hidrólise enzimática proporcionou maior hidrólise das proteínas, gerando maior grau de hidrólise e maior atividade antioxidante aos hidrolisados.

### **3.4 Efeito do ultrassom (sem e com), da enzima (0 e 8%) e dos diferentes tipos de colágeno para proteína, grau de hidrólise e atividade antioxidante**

O efeito da interação colágeno x enzima x ultrassom foi significativo ( $p < 0,0001$ ) para as variáveis proteína e grau de hidrólise e não significativo ( $p > 0,05$ ) para atividade antioxidante, ou seja, as variações nos valores médios das mesmas estão diretamente ligadas com o tipo de colágeno, porcentagem de enzima e utilização ou não do ultrassom no processo de hidrólise, podendo esses afetar diretamente a funcionalidade dos peptídeos gerados na hidrólise (**Tabela 6**).

Houve correlação negativa ( $p < 0,001$ ) entre os valores de proteína e grau de hidrólise ( $r = -0,81$ ). Teores maiores de proteína resultaram em menor grau de hidrólise, mostrando menor atuação da enzima e do ultrassom frente ao substrato (**Tabela 7**). No estudo realizado por Zavareze *et al.* [8] com hidrolisados proteicos de Cabrinha (*Prionotus punctatus*) também foi encontrado uma relação entre a atividade específica das enzimas e o grau de hidrólise. A boa atividade da enzima no processo de hidrólise proporcionou maior rompimento das proteínas, gerando peptídeos menores e consequentemente maior grau de hidrólise.

Os valores de proteína e atividade antioxidante apresentaram correlação negativa ( $p < 0,0001$ ) ( $r = -0,62$ ), indicando que valores maiores ou menores de proteína estão relacionados à variação da atividade antioxidante, isso se deve a geração de peptídeos de alta funcionalidade durante a hidrólise. Os valores de grau de hidrólise e atividade antioxidante apresentaram correlação positiva ( $p < 0,01$ ) ( $r = 0,41$ ), onde a funcionalidade dos hidrolisados gerados foi aumentada pela maior ruptura da estrutura protéica causada pela hidrólise enzimática concomitante ou não ao ultrassom.

### 3.5 Médias de proteína, grau de hidrólise e atividade antioxidante para as amostras de hidrolisados de diferentes colágenos sob efeito da interação ultrassom vs. enzima vs. colágeno

A amostra FB bruta apresentou valor médio de proteína igual a 7,49 mg/mL, já quando tratada com 8% de enzima e ultrassom concomitante seu teor de proteína passou para 4,17 mg/mL, representando grau de hidrólise igual a 44,5% (**Tabela 8**). A redução no valor de proteína foi provocada pela atuação da enzima em conjunto com o ultrassom, este último provocou cavitação do meio, facilitando o rompimento da estrutura protéica e atuação enzimática (enzima/substrato), conseqüentemente frações menores de proteínas foram geradas. Entretanto, apesar da enzima e do ultrassom concomitante terem proporcionado a essa amostra maior valor de grau de hidrólise, o valor de atividade antioxidante encontrado para esse tratamento foi similar ao do tratamento utilizando apenas a enzima (**Tabela 8**), o qual resultou em grau de hidrólise igual a 24,6%. Esses valores mostram que os peptídeos gerados apenas na hidrólise com 8% de enzima foram tão funcionais quanto os gerados na hidrólise com 8% de enzima e ultrassom concomitante. Isso pode ser explicado pela máxima geração, em curto período, de peptídeos com atividade de eliminação de radicais DPPH, os quais foram hidrolisados em sequências inativas posteriormente [37].

O mesmo ocorreu para a amostra FP hidrolisada com 8% de enzima e ultrassom concomitante, onde o valor de FP bruta passou de 8,64 mg/mL para 5,88 mg/mL, representando grau de hidrólise igual a 37,0%. Todavia, a amostra FP hidrolisada apenas com ultrassom (grau de hidrólise igual a 5,68%) ou com enzima (grau de hidrólise igual a 25,4%) apresentou maior atividade antioxidante, 28,7 e 24,7% respectivamente, do que quando tratada com 8% de enzima e ultrassom concomitante, 14,3%. Isso mostra que para a amostra FP não é viável a utilização concomitante de enzima e ultrassom, sendo levado em consideração que estes, apesar de terem possibilitado maior hidrólise da amostra, geraram peptídeos com funcionalidade inferior. Provavelmente o ultrassom concomitante a hidrólise enzimática desviou a atuação da enzima frente ao substrato, fazendo com que essa tenha atuado sobre ligações diferentes das habituais, sem deixar de romper a estrutura proteica.

A utilização de 8% de enzima na hidrólise da amostra PEP gerou menores valores de proteína, conseqüentemente maiores valores de grau de hidrólise. A utilização apenas do ultrassom na hidrólise dessa amostra possibilitou atividade antioxidante do hidrolisado tão boa quanto à utilização de 8% de enzima e ultrassom concomitante. O valor de atividade antioxidante da amostra PEP quando hidrolisada apenas com enzima foi semelhante ao valor obtido da hidrólise concomitante de enzima e ultrassom. A nível industrial, para essa amostra

é mais interessante a hidrólise apenas com enzima ou com ultrassom, visto que, esses possibilitaram ao produto valor de atividade antioxidante equivalente ao hidrolisado com a utilização de ambos, sendo assim, gerando menores gastos e maior lucro a indústria.

A amostra PTL, amostra comercial que já passou por processo de hidrólise, reagiu bem à atuação da enzima e do ultrassom analisando os valores de proteína e grau de hidrólise. Onde o teor de proteína variou de 6,41 até 3,93 mg/mL e o grau de hidrólise de 0,00 até 33,3%. A amostra PTL bruta já apresentava boa atividade antioxidante, a utilização apenas do ultrassom no tratamento dessa amostra fez com que esse valor fosse reduzido, mostrando que a utilização do mesmo não é favorável para esta amostra dentro das condições testadas, sendo assim a utilização apenas da enzima no processo de hidrólise da mesma é melhor, pois possibilitou atividade antioxidante de 52,2%.

Quando tratada com 0% de enzima e sem ultrassom a amostra GEL apresentou valor de proteína igual a 7,46 mg/mL, a utilização dos tratamentos, 8% de enzima ou 8% de enzima e ultrassom concomitante, provocaram um decréscimo nesse valor, chegando a até 3,89 mg/mL. Para o grau de hidrólise a utilização apenas da enzima gerou valor igual a 23,6% e da enzima e ultrassom concomitante igual a 47,9%, valor este, o maior encontrado entre as amostras para esta variável. Já no estudo realizado por Diniz & Martin [38] sobre o efeito do pH, temperatura e proporção de enzima/substrato no grau de hidrólise de proteína de músculo de cação com a enzima alcalase foi encontrado grau de hidrólise igual a 15,6% utilizando uma concentração enzimática em relação ao substrato de 2%, valor abaixo do encontrado nesse estudo. A atividade antioxidante da amostra GEL foi maior quando hidrolisada apenas com 8% de enzima, resultado maior do que os encontrados para os demais tratamentos. No estudo realizado por Corrêa [39], utilizando peptídeos bioativos obtidos a partir da hidrólise enzimática de caseinato ovino e soro de queijo ovino, os hidrolisados mostraram baixa capacidade em capturar o radical 2,2-difenil-1-picrilidrzila (DPPH), apresentando maior atividade (31%) após uma hora de hidrólise.

A utilização de 8% de enzima concomitante ou não ao ultrassom no processo de hidrólise da amostra ROU gerou menores teores de proteínas, maiores valores de grau de hidrólise e atividade antioxidante quando comparada a utilização de 0% de enzima associada ou não ao ultrassom. O tratamento que possibilitou a amostra ROU maior atividade antioxidante foi à hidrólise enzimática, entretanto, não foi o que gerou maior grau de hidrólise.

Li *et al.* [13] estudaram hidrolisados de colágeno suíno obtidos através de hidrólise enzimática (protease de pâncreas bovino, protease de *Streptomyces* e proteases de *Bacillus*

spp.) e estes apresentaram atividade antioxidante, em especial as sequências: Gln-Gly-Ala-Arg, Hyp-Cys, Leu-Gln-Gly-Met e Leu-Gln-Gly-Met-Hyp. Já no estudo de Kim *et al.* [40] a sequência de aminoácidos Gly-Pro-Hyp-Gly-Pro-Hyp-Gly-Pro-Hyp-Cys obtidos por hidrólise enzimática de couro bovino também apresentaram atividade antioxidante. Como nesse estudo, os hidrolisados dessas pesquisas também apresentaram atividade antioxidante.

A atividade antioxidante dos peptídeos está associada ao poder antioxidante dos aminoácidos presentes em sequência. Um dos aminoácidos mais conhecidos por possuir capacidade antioxidante é a histidina. Funcionalidade atribuída à capacidade quelante e de aprisionamento do radical lipídico do anel de imidazol [41]. Já a atividade da tirosina e da fenilalanina é atribuída à capacidade de aturem como captadores de radicais [42]. Outros peptídeos também foram encontrados nas sequências de peptídeos antioxidantes, como alanina, leucina e glicina [43, 44].

No geral, a amostra PTL foi a que apresentou menor grau de hidrólise e maior atividade antioxidante. Apesar do tratamento de hidrólise enzimática concomitante ao ultrassom ter proporcionado as amostras maior grau de hidrólise não levou a maior atividade antioxidante, mostrando que a hidrólise proteica demasiada afeta negativamente a funcionalidade dos hidrolisados, isso se deve a geração de peptídeos não funcionais ou pouco funcionais. O hidrolisado da amostra FP foi o que apresentou menor atividade antioxidante entre as médias por colágeno, já os hidrolisados das amostras FB, GEL e ROU apresentaram valores parecidos.

Já se esperava que as amostras PEP e PTL (amostras comerciais já hidrolisadas) gerassem hidrolisados protéicos de maior atividade antioxidante, pois apresentavam estruturas protéicas menores e mais biodisponíveis a hidrólise. As amostras de gelatina (GEL e ROU) apresentaram boa disponibilidade ao processo de hidrólise possibilitando a geração de hidrolisados com boa funcionalidade. As amostras de fibra de colágeno (FB e FP) possuem estruturas protéicas maiores, mais íntegras. A amostra FB possibilitou boa atuação da enzima gerando hidrolisados com boa funcionalidade, todavia a amostra FP, apesar da boa atuação enzimática e do ultrassom, não gerou hidrolisados com valores de atividade antioxidante esperados, sendo dentre as amostras a que gerou hidrolisado com menor potencial antioxidante.

Para as amostras FB, PTL, GEL e ROU, analisando apenas a funcionalidade dos hidrolisados gerados, o melhor tratamento foi à hidrólise enzimática, já para FP e PEP foi à hidrólise por ultrassom, seguida da enzimática.

### 3.6 Potencial antimicrobiano dos hidrolisados

Para a inibição da bactéria gram-negativa *Salmonella choleraesuis* a amostra que apresentou melhor resultado foi a FB EHU, concentração de amostra menor que 10%, e para a bactéria gram-positiva *Staphylococcus aureus* foram PEP EHU, PEP UEH, ROU EHU, FB UEH, FB EH, FP EHU e FP EH, concentração de amostra menor que 10% (**Tabela 9**). No estudo realizado por Soares [45] utilizando hidrolisado protéico de torta de soja obtido em pH 7,0 com uso da papaína, frente à bactéria gram-positiva *Staphylococcus aureus*, uma concentração de hidrolisado igual a 3,753 mg/mL foi capaz de inibir o crescimento bacteriano.

A utilização do ultrassom concomitante à enzima no processo de hidrólise favoreceu a atividade antimicrobiana, isso pode ser explicado pela melhor ligação do peptídeo com a membrana celular bacteriana, inibindo o crescimento de micro-organismos.

## 4. CONCLUSÃO

A utilização do ultrassom prévio ou concomitante potencializou a hidrólise enzimática das amostras de colágenos bovinos, gerando maior quantidade de bandas em número de onda ( $\text{cm}^{-1}$ ). A concentração enzimática de 8% e o ultrassom concomitante se mostraram melhores no processo de hidrólise das amostras, conferindo-as menores teores de proteína e maiores valores de grau de hidrólise. O hidrolisado da amostra comercial hidrolisado 1 foi o que apresentou menor grau de hidrólise, entretanto foi o que obteve maior atividade antioxidante. A hidrólise protéica em excesso afetou negativamente as propriedades funcionais dos hidrolisados, o que foi ocasionado pela geração de peptídeos sem funcionalidade ou com poucas propriedades funcionais. Para as amostras comerciais fibra, hidrolisado 1, gelatina 1 e gelatina 2, analisando apenas a funcionalidade dos hidrolisados gerados, o melhor tratamento foi à hidrólise enzimática, já para fibra pó e hidrolisado 2 foi a hidrólise por ultrassom.

A amostra que possibilitou maior inibição do crescimento da bactéria gram-negativa *Salmonella choleraesuis* foi à fibra hidrolisada com enzima e ultrassom concomitante. Para a bactéria gram-positiva *Staphylococcus aureus* foram as amostras comerciais hidrolisado 2, gelatina 2 e fibra pó hidrolisadas com enzima e ultrassom concomitante, também, hidrolisado 2 e fibra tratadas com ultrassom e posterior hidrólise enzimática e fibra e fibra pó hidrolisadas enzimaticamente, mostrando que a enzima e o ultrassom favoreceram a ligação do peptídeo com a membrana celular bacteriana inibindo o crescimento de micro-organismos. Diante disso, pode-se concluir que a enzima foi melhor na hidrólise das amostras, proporcionando

rompimento estrutural e maior funcionalidade aos hidrolisados de diferentes colágenos bovinos.

## 5. AGRADECIMENTOS

A FAPERGS e ao CNPQ pela ajuda financeira para aquisição de equipamentos e de reagentes, como também de bolsas de iniciação científica. As empresas Novaprom e Rousselot pela doação das amostras utilizadas nesse estudo. A Universidade Estadual de Ponta Grossa e a Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e das Missões pela ajuda com as análises de espectroscopia na região do infravermelho com transformada de Fourier e antimicrobianas. Ao Edital Capes nº 27/2010 – Pró – Equipamentos Institucional pela possibilidade de utilização do liofilizador. A Universidade Federal de Santa Maria pela infraestrutura disponibilizada e pelas bolsas de iniciação científica concedidas. A CAPES pela bolsa de pós-graduação e ao Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos.

## 6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] Z.Y. Liu, A.C.M. Oliveira & Y.C. Su, Characterization of pepsin-solubilized collagen from skin and connective tissue of giant red sea cucumber (*Parastichopus californicus*), *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 58 (2010) 1270–1274.
- [2] F. Pati, B. Adhikari & S. Dhara, Isolation and characterization of fish scale collagen of higher thermal stability, *Bioresource Technology*, 101 (2010) 3737-3742.
- [3] E.A. Decker, & Y. Park, Healthier meat products as functional foods, *Meat Science*, 86 (2010) 49-55.
- [4] J.D. Webster, D.A. Ledward & R.A. Lawrie, Protein hydrolysates from meat industry by-products, *Meat Science*, 7 (1982) 147-157.
- [5] M.C. Gómez-Guillén, B. Giménez, M.E. López-Caballero & M.P. Montero, Functional and bioactive properties of collagen and gelatin from alternative sources: A review, *Food Hydrocolloids*, 25 (2011) 1813-1827.
- [6] M.I. Khan, M.S. Arshad, F.M. Anjum, A. Sameen, A. Rehman & W. Gill, Meat as a functional food with special reference to probiotic sausages, *Food Research International*, 44 (2011) 3125-3133.
- [7] R.D. Bernardini, P. Harnedy, D. Bolton, J. Kerry, E. O'Neill, A.M. Mullen & M. Hayes, Antioxidant and antimicrobial peptidic hydrolysates from muscle protein sources and by-products, *Food Chemistry*, 134 (2011) 1296-1307.

- [8] E.R. Zavareze, C. M. Silva, M. Salas-Mellado & C. Prentice-Hernández, Funcionalidade de hidrolisados proteicos de cabrinha (*Prionotus punctatus*) obtidos a partir de diferentes proteases microbianas, *Química Nova*, 32(7) (2009) 1739-1743.
- [9] N. Bhaskar, V. K. Modi, K. Govindaraju, C. Radha & R.G. Lalitha, Utilization of meat industry by products: protein hydrolysate from sheep visceral mass, *Bioresource technology* 98 (2) (2007) 388-394.
- [10] V.D.M. Silva & M.P.C. Silvestre, Functional properties of bovine plasma intended for use as a functional ingredient in human food, *Food Science and Technology*, 37(6) (2003) 709-18.
- [11] H. G. Kristinsson & B. A. Rasco, Fish Protein Hydrolysates: Production, Biochemical, and Functional Properties, *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 40(1) (2000) 43-81.
- [12] R. Slizyte, E. Dauksas, E. Falch, I. Storrø & T. Rustad, Yield and composition of different fractions obtained after enzymatic hydrolysis of cod (*Gadus morhua*) byproducts, *Process Biochemistry*, 40 (2005) 1415-1424.
- [13] B. Li, F. Chen, X. Xang, B. Ji & Y. Wu, Isolation and identification of antioxidative peptides from porcine collagen hydrolysate by consecutive chromatography and eletrospray ionization-mass spectrometry, *Food Chemistry*, 102 (2007) 1135-1143.
- [14] S.K. Kim, H.G. Byun, P.J. Park & F. Shahidi, Angiotensin I-converting enzyme inhibitory peptides purified from bovine skin gelatin hydrolysate, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49 (2001) 2992-2997.
- [15] G. Herregods, J. Camp, M. Morel, B. Ghesquiere, K. Gevaert, L. Vercruyssen, et al. Angiotensin I-converting enzyme inhibitory activity of gelatin hydrolysates and identification of bioactive peptides, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 59 (2011) 552-558.
- [16] M. Ashokkumar, Applications of ultrasound in food and bioprocessing, *Ultrasonics Sonochemistry*, 25 (2015) 17-23.
- [17] A.C. Soria, & M. Villamiel, Effect of ultrasound on the technological properties and bioactivity of food: a review, *Trends in Food Science & Technology*, 21(7) (2010) 323-331.
- [18] J. Chandrapala, B. Zisu, M. Palmer, S. Kentish & M. Ashokkumar, Effects of ultrasound on the thermal and structural characteristics of proteins in reconstituted whey protein concentrate, *Ultrasonics Sonochemistry*, 18(5) (2011) 951-957.
- [19] C. Arzeni, K. Martínez, P. Zema, A. Arias, O.E. Pérez & A.M.R. Pilosof, Comparative study of high intensity ultrasound effects on food proteins functionality, *Journal of Food Engineering*, 108(3) (2012a) 463-472.

- [20] A.R. Jambrak, T.J. Mason, V. Lelas & G. Krešić, Ultrasonic effect on physicochemical and functional properties of  $\alpha$ -lactalbumin LWT, *Food Science and Technology*, 43 (2) (2010) 254–262.
- [21] J. O'Sullivan, B. Murray, C. Flynn & I. Norton, The effect of ultrasound treatment on the structural, physical and emulsifying properties of animal and vegetable proteins, *Food Hydrocolloids*, 53 (2015) 141-154.
- [22] C. Ozuna, I.P. Martínez, E. C. Tostado, L. Ozimek, S. L. Amaya-Llano, Innovative applications of high-intensity ultrasound in the development of functional food ingredients: Production of protein hydrolysates and bioactive peptides, *Food Research International*, 77 (2015) 685–696.
- [23] R.C. Prestes, A. Graboski, S. S. Roman, A. P. Kempka, G. Toniazzi, I. M. Demiate & M. Diluccio, Effects of the addition of collagen and degree of comminution in the quality of chicken ham, *Poultry Science Association*, 22 (2013) 885–903.
- [24] Rousselot, Certificado de Análise, Rousselot Gelatinas do Brasil Ltda, (2014).
- [25] Gelita, Certificado de Análises, Gelita do Brasil Ltda, (2014).
- [26] C.G. Schmidt & M. Sallas-Mellado, Influência da ação das enzimas alcalase e flavourzyme no grau de hidrólise das proteínas de carne de frango, *Química Nova*, 32(5) (2009) 1144-1150.
- [27] I.M. Demiate, N. Dupuy, J.P. Huvenne, M.P. Cereda, & G. Wosiacki, Relationship between baking behavior of modified cassava starches and starch chemical structure determined by FTIR spectroscopy, *Carbohydrate Polymers*, 42 (2000) 149-158.
- [28] O.H. Lowry, N.J. Rosebrough, A.L. Farr & R.J. Randall, Protein measurement with the folin phenol reagent, *Journal of Biological Chemistry*, 193 (1951) 265-75.
- [29] W. Brand-Williams, M.E. Cuvelier & C. Berset, Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity, *Food Science and Technology*, 28 (1995) 25-30.
- [30] C. Sanchez-Moreno, J.A. Larrauri & F. Saura-Calixto, A procedure to measure the antiradical efficiency of polyphenols, *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 76(2) (1998) 270-276.
- [31] M. K. Pierozan, G. F. Pauletti, L. Rota, A. C. A dos Santos, L. A. Lerin, M. Di Luccio, A. J. Mossi, L. Atti-Serafini, R. L. Cansian & V. J. Oliveira, Chemical characterization and antimicrobial activity of essential oils of *salvia* L. species. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, 29(4) (2009) 764-770.
- [32] A. A. F. Zielinski, C. W. I. Haminiuk, C. A. Nunes, E. Schnitzler, S. M. Van Ruth & D. Granato, Chemical composition, sensory properties, provenance, and bioactivity of fruti juices

as assessed by chemometrics: A critical review and guideline, *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 13(3) (2014) 300–316.

[33] J. Kong, & S. Yu, Fourier transform infrared spectroscopic analysis of protein secondary structures, *Acta Biochimica et Biophysica Sinica*, 39(8) (2007) 549–559.

[34] Z. Li, B. Wang, C. Chi, Y. Gong, H. Luo, G. Ding, Influence of average molecular weight on antioxidant and functional properties of cartilage collagen hydrolysates from *Sphyrna lewini*, *Dasyatis akjei* and *Raja porosa*, *Food Research International*, 51 (2013) 283–293.

[35] Z. Yu, W. Zeng & X. Lu, Influence of ultrasound to the activity of tyrosinase. *Ultrasonics Sonochemistry*, 20 (2013) 805-809.

[36] Z. Knezevic-Jugovic, A. Stefanovic, M. Zuza, S. Milovanovic, S. Jakovetic, V. Manojlovic & B. Bugarski, Effects of sonication and high-pressure carbon dioxide processing on enzymatic hydrolysis of egg white proteins, *Acta Periodica Technologica*, 43 (2012) 33–41.

[37] P.J. García-Moreno, I. Batista, C. Pires, N.M. Bandarra, F.J. Espejo-Carpio, A. Guadix & E.M. Guadix, Antioxidant activity of protein hydrolysates obtained from discarded Mediterranean fish species, *Food Research International*, 65 (2014) 469-476.

[38] F. M. Diniz & A. M. Martin, Use of response surface methodology to describe the combined effects of pH, temperature and E/S ratio on the hydrolysis of dogfish (*Squalus acanthias*) muscle, *Int. J. Food Science and Technology*, 31 (1996) 419-426.

[39] A.P.F. Corrêa, Obtenção de peptídeos bioativos a partir da hidrólise enzimática de caseinato ovino soro de queijo ovino, Tese de doutorado, Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola e do Ambiente, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Brasil, (2013) 103 pág.

[40] S.K. Kim, H.G. Byun, P.J. Park & F. Shahidi, Angiotensin I-converting enzyme inhibitory peptides purified from bovine skin gelatin hydrolysate, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49 (2001) 2992-2997.

[41] J.-Y. Je, P.-J. Park & S.-K. Kim, Antioxidant activity of a peptide isolated from Alaska pollack (*Theragra chalcogramma*) frame protein hydrolysate, *Food Research International*, 38(1) (2005) 45–50.

[42] J. Ren, M. Zhao, J. Shi, J. Wang, Y. Jiang, C. Cui, Y. Kakuda & S.J. Xue, Purification and identification of antioxidant peptides from grass carp muscle hydrolysates by consecutive chromatography and electrospray ionization–mass spectrometry, *Food Chemistry*, 108 (2008) 727–736.

- [43] K.-C. Hsu, Purification of antioxidant peptides prepared from enzymatic hydrolysates of tuna dark muscle by-product. *Food Chemistry*, 122 (2010) 42–48.
- [44] N. Rajapakse, E. Mendis, H.-G. Byun & S.-K. Kim, Purification and in vitro antioxidative effects of giant squid muscle peptides on free radical-mediated oxidative systems, *Journal of Nutrition and Biochemistry*, 16 (2005) 562–569.
- [45] N.B. Soares, Obtenção de hidrolisado proteico de torta de soja e avaliação da sua atividade antimicrobiana, Dissertação de mestrado, Programa de Pós- Graduação em Alimentos e Nutrição da Universidade Federal do Estado do Rio de Janeiro, Brasil, (2013) 89 pág.

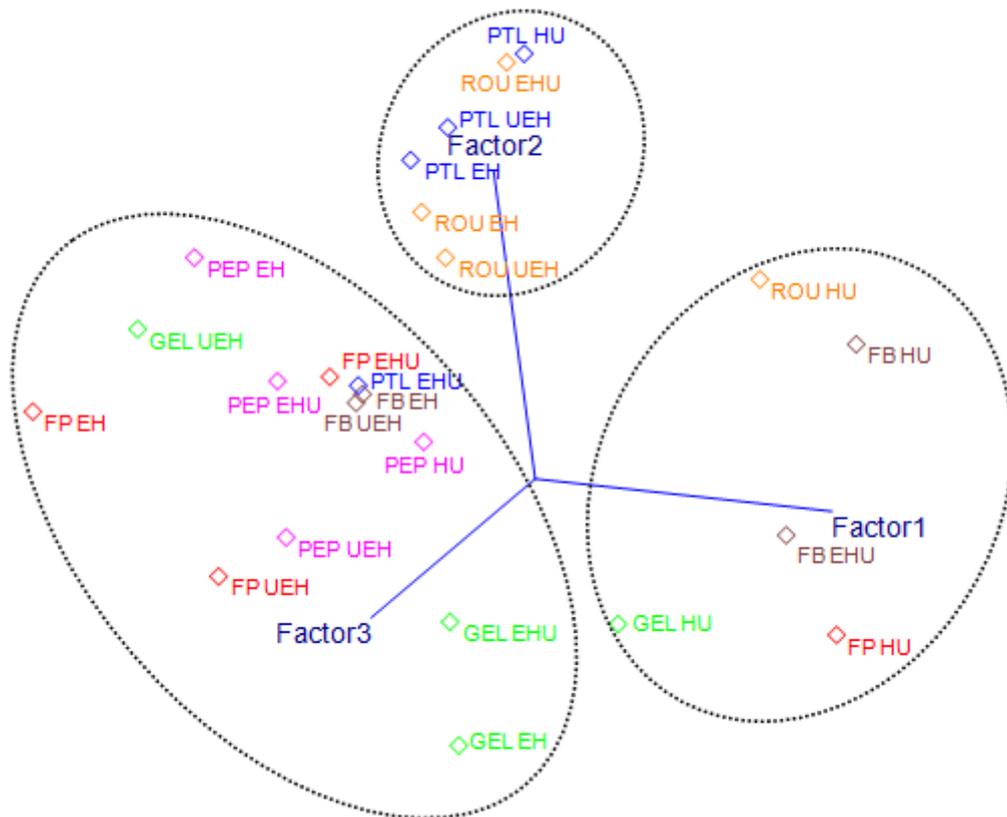
**Tabela 1** – Diferentes tipos de colágenos bovinos utilizados para obtenção de hidrolisados proteicos.

<b>Tipos de colágenos</b>	<b>Fibra natural</b>	<b>Fibra em pó</b>	<b>Gelatina 1</b>	<b>Gelatina 2</b>	<b>Hidrolisado 1</b>	<b>Hidrolisado 2</b>
<b>Nome/Sigla</b>	Fibra/FB	Fibra pó/FP	Gelita <sup>®</sup> /GEL	Rousselot <sup>®</sup> /ROU	Peptiplus <sup>®</sup> /PTL	Peptan B <sup>®</sup> /PEP
<b>Fabricante</b>	Novaprom Food Ingredients Ltda (Lins – SP - Brasil)	Novaprom Food Ingredients Ltda (Lins – SP- Brasil)	Gelita do Brasil Ltda (Cotia – SP- Brasil)	Rousselot Gelatinas do Brasil Ltda (Amparo – SP- Brasil)	Gelita do Brasil Ltda (Cotia – SP- Brasil)	Rousselot Gelatinas do Brasil Ltda (Amparo – SP- Brasil)
<b>Descrição</b>	Tamanho de partícula entre 1,80 e 1,92 mm, matéria-prima: pele bovina, tratamento alcalino, pH entre 7 e 9,5	Tamanho de partícula entre 0,45 e 0,57 mm, matéria-prima: pele bovina, tratamento alcalino, pH entre 7 e 9,5	Matéria-prima: couro ou diversas fontes, hidrólise parcial alcalina (tratamento drástico), 236 g de Bloom; 40 mP de viscosidade; 11% de umidade; pH 5,6; <= 2% de cinzas	Matéria-prima: couro ou diversas fontes, hidrólise parcial alcalina (tratamento drástico), 250g de Bloom; 3,8 mP de viscosidade; 12,4% de umidade; pH 5,5; <=2% de cinzas	Matéria-prima: couro bovino/ pele suína, hidrólise química + enzimática, 39 mP de viscosidade; 5,9% de umidade; 92,1% de proteínas; pH 5,7; <=2% de cinzas	Matéria-prima: couro bovino/ pele suína, hidrólise química + enzimática, 4 mP de viscosidade; 7,2% de umidade; 92,15% de proteína; pH 6; 0,65% de cinzas

Fonte: [23-25].

**Tabela 2** – Tratamentos de hidrólise utilizados para obtenção dos hidrolisados proteicos de diferentes colágenos bovinos.

<b>Sigla</b>	<b>Descrição dos tratamentos</b>	<b>Enzima</b>	<b>Ultrassom</b>	<b>T °C</b>	<b>Tempo (h)</b>	<b>pH</b>
CC	Colágenos brutos	Não	Não	50	2	7,0
HU	Hidrólise por ultrassom	Não	Sim	50	2	7,0
EH	Hidrólise enzimática	Sim	Não	50	2	7,0
EHU	Hidrólise enzimática com ultrassom concomitante	Sim	Sim	50	2	7,0
UEH	Tratados previamente com ultrassom e posterior hidrólise enzimática	Sim	Sim	50	4	7,0



**Fig. 1** Dispersão tridimensional da parcela obtida pela PCA com base na região 500-1722  $\text{cm}^{-1}$ .

FB – fibra natural de colágeno; FP – fibra de colágeno em pó; PEP – colágeno hidrolisado 2; PTL – colágeno hidrolisado 1; GEL – gelatina 1; ROU – gelatina 2. HU – hidrólise por ultrassom; EH – hidrólise enzimática; EHU – hidrólise enzimática com ultrassom concomitante; UEH – tratados previamente com ultrassom e posterior hidrólise enzimática.

**Tabela 3** - Valores probabilísticos para avaliação do efeito do ultrassom prévio ou concomitante a aplicação da enzima Flavourzyme<sup>®</sup> sobre as variáveis proteína (mg/mL), grau de hidrólise (%), e atividade antioxidante (%).

<b>Efeitos</b>	<b>ptn</b>	<b>GH</b>	<b>AA</b>
<b>Colágeno</b>	0,0001	0,0001	0,0001
<b>Ultrassom</b>	0,0001	0,0001	0,0566
<b>Colágeno × Ultrassom</b>	0,0232	0,0001	0,0825
<b>Média</b>	6,03	20,40	37,22
<b>CV</b>	1,75	1,33	15,89

ptn – proteína; GH – grau de hidrólise e AA – atividade antioxidante. CV (%) – coeficiente de variação.

**Tabela 4** - Coeficientes da correlação de Spearman entre as variáveis proteína (mg/mL), grau de hidrólise (%) e atividade antioxidante (%) dos hidrolisados de colágeno.

	<b>ptn</b>	<b>GH</b>	<b>AA</b>
<b>ptn</b>		-0,80***	-0,37*
<b>GH</b>			0,12 <sup>ns</sup>
<b>AA</b>			

ptn – proteína; GH – grau de hidrólise e AA – atividade antioxidante. <sup>ns</sup>Não significativo (p>0,05); \*Significativo (p<0,05); \*\*Significativo (p<0,01); \*\*\*Significativo (p<0,001).

**Tabela 5** - Médias totais de proteína, grau de hidrólise e atividade antioxidante para as amostras de hidrolisados de colágeno, avaliando o efeito do ultrassom na hidrólise enzimática.

	<b>Ultrassom</b>	
	<b>Prévio</b>	<b>Concomitante</b>
<b>Proteína, mg/mL</b>	7,89 <sup>a</sup>	4,33 <sup>b</sup>
<b>Grau de hidrólise, %</b>	0,00 <sup>b</sup>	40,80 <sup>a</sup>
<b>Atividade antioxidante, %</b>	33,63	38,01

Médias seguidas por letras minúsculas distintas na mesma linha diferem ( $p < 0,05$ ) entre ultrassom pelo teste "t".

**Tabela 6** - Valores probabilísticos para avaliação do efeito do ultrassom (sem e com), da enzima (0 e 8%) e dos diferentes tipos de colágeno sobre as variáveis proteína (mg/mL), grau de hidrólise (%) e atividade antioxidante (%).

<b>Efeitos</b>	<b>ptn</b>	<b>GH</b>	<b>AA</b>
<b>Colágeno</b>	0,0001	0,0001	0,0001
<b>Enzima</b>	0,0001	0,0001	0,0001
<b>Ultrassom</b>	0,0001	0,0001	0,4639
<b>Enzima × Ultrassom</b>	0,0001	0,0001	0,0014
<b>Colágeno × Enzima</b>	0,0001	0,0001	0,0001
<b>Colágeno × Ultrassom</b>	0,0120	0,0007	0,0063
<b>Colágeno × Enzima × Ultrassom</b>	0,0001	0,0001	0,0670
<b>Média</b>	6,19	16,43	32,68
<b>CV</b>	2,14	1,32	22,94

ptn – proteína; GH – grau de hidrólise e AA – atividade antioxidante. CV (%) – coeficiente de variação.

**Tabela 7** - Coeficientes da correlação de Spearman entre as variáveis proteína (mg/mL), grau de hidrólise (%) e atividade antioxidante (%) dos hidrolisados de colágeno.

	<b>ptn</b>	<b>GH</b>	<b>AA</b>
<b>ptn</b>		-0,81***	-0,62***
<b>GH</b>			0,41**
<b>AA</b>			

ptn – proteína; GH – grau de hidrólise e AA – atividade antioxidante. <sup>ns</sup>Não significativo (p>0,05); \*Significativo (p<0,05); \*\*Significativo (p<0,01); \*\*\*Significativo (p<0,001).

**Tabela 8** – Médias de proteína, grau de hidrólise e atividade antioxidante para as diferentes amostras de hidrolisados de colágeno.

Colágeno**	Enzima, %	US conc*		Média enzima	Média colágeno	US conc*		Média enzima	Média colágeno	US conc*		Média enzima	Média colágeno
		Sem	Com			Sem	Com			Sem	Com		
				Proteína, mg/mL		Grau de hidrólise, %				Atividade antioxidante, %			
FB	0	7,49 <sup>A</sup>	7,54 <sup>A</sup>	7,52	6,22 <sup>B</sup>	0,00 <sup>B</sup>	0,00 <sup>B</sup>	0,00	17,3 <sup>A</sup>	5,32 <sup>bb</sup>	20,0 <sup>Ab</sup>	12,7	28,6 <sup>B</sup>
	8	5,66 <sup>ab</sup>	4,17 <sup>bb</sup>	4,92		24,6 <sup>bA</sup>	44,5 <sup>aA</sup>	34,5		43,9 <sup>A</sup>	45,3 <sup>A</sup>	44,6	
Média ultrassom		6,58	5,86			12,3	22,2			24,6	32,7		
FP	0	8,64 <sup>aA</sup>	8,22 <sup>bA</sup>	8,43	7,37 <sup>A</sup>	0,00 <sup>bb</sup>	5,68 <sup>ab</sup>	2,84	17,0 <sup>AB</sup>	15,8 <sup>b</sup>	28,7 <sup>aA</sup>	22,2	20,9 <sup>B</sup>
	8	6,75 <sup>ab</sup>	5,88 <sup>bb</sup>	6,32		25,4 <sup>bA</sup>	37,0 <sup>aA</sup>	31,2		24,7	14,3 <sup>B</sup>	19,5	
Média ultrassom		7,69	7,05			12,7	21,3			20,2	21,5		
PEP	0	6,84 <sup>A</sup>	6,72 <sup>A</sup>	6,78	5,65 <sup>C</sup>	0,00 <sup>B</sup>	1,98 <sup>B</sup>	0,99	16,0 <sup>B</sup>	35,8 <sup>A</sup>	45,2	40,5	42,0 <sup>A</sup>
	8	5,05 <sup>ab</sup>	4,00 <sup>bb</sup>	4,53		23,9 <sup>bA</sup>	38,0 <sup>aA</sup>	30,9		40,2 <sup>A</sup>	46,8	43,5	
Média ultrassom		5,95	5,36			11,9	20,0			38,0	46,0		
PTL	0	6,41 <sup>A</sup>	6,44 <sup>A</sup>	6,42	5,39 <sup>D</sup>	0,00 <sup>B</sup>	0,00 <sup>B</sup>	0,03	13,7 <sup>C</sup>	43,1 <sup>a</sup>	30,0 <sup>bb</sup>	36,5	43,6 <sup>A</sup>
	8	4,80 <sup>ab</sup>	3,93 <sup>bb</sup>	4,36		21,6 <sup>bA</sup>	33,3 <sup>aA</sup>	27,4		52,2	47,8 <sup>A</sup>	50,0	
Média ultrassom		5,61	5,18			10,8	16,7			47,6	38,9		
GEL	0	7,46 <sup>A</sup>	7,60 <sup>A</sup>	7,53	6,16 <sup>B</sup>	0,00 <sup>B</sup>	0,00 <sup>B</sup>	0,00	17,9 <sup>A</sup>	21,4 <sup>B</sup>	19,8	20,6	29,4 <sup>B</sup>
	8	5,70 <sup>ab</sup>	3,89 <sup>bb</sup>	4,79		23,6 <sup>bA</sup>	47,9 <sup>aA</sup>	35,8		47,2 <sup>aA</sup>	29,2 <sup>b</sup>	38,2	
Média ultrassom		6,58	5,75			11,8	23,9			34,3	24,5		
ROU	0	7,54 <sup>A</sup>	7,49 <sup>A</sup>	7,52	6,24 <sup>B</sup>	0,00 <sup>B</sup>	0,61 <sup>B</sup>	0,31	17,4 <sup>A</sup>	2,8 <sup>bb</sup>	25,6 <sup>ab</sup>	14,2	29,0 <sup>B</sup>
	8	5,69 <sup>ab</sup>	4,25 <sup>bb</sup>	4,97		24,8 <sup>bA</sup>	44,1 <sup>aA</sup>	34,5		46,0 <sup>A</sup>	41,6 <sup>A</sup>	43,8	
Média ultrassom		6,61	5,87			12,4	22,4			24,4	33,6		
Média geral ultrassom		6,50	5,84			12,0	21,1			31,5	32,9		

\*\*FB – fibra de colágeno; FP – fibra de colágeno em pó; PEP – colágeno hidrolisado 2; PTL – colágeno hidrolisado 1; GEL – gelatina 1; ROU – gelatina 2. \*US conc – ultrassom concomitante. Médias seguidas por letras minúsculas distintas na mesma linha diferem (p<0,05) entre ultrassom pelo teste “t”. Médias seguidas por letras maiúsculas distintas na mesma coluna diferem (p<0,05) entre enzima ou colágeno pelo teste “t”.

**Tabela 9** - Concentração Inibitória Mínima (CIM), dos hidrolisados de diferentes colágenos bovinos, necessária para inibição da bactéria Gram-negativa (*Salmonella choleraesuis* - ATTC 10708) e Gram-positiva (*Staphylococcus aureus* - ATTC 6538).

Hidrolisados de colágeno**	Bactérias	
	<i>Salmonella choleraesuis</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>
FB EHU	<10,0%	25,0%
FB HU	-*	-
FB UEH	>25,0%	<10,0%
FB EH	>25,0%	<10,0%
FP EHU	>25,0%	<10,0%
FP HU	>25,0%	17,5%
FP UEH	>25,0%	17,5%
FP EH	15,0%	<10,0%
PEP EHU	>25,0%	<10,0%
PEP HU	>25,0%	<15,0%
PEP UEH	>25,0%	<10,0%
PEP EH	>25,0%	<15,0%
PTL EHU	>25,0%	15,0%
PTL HU	>25,0%	>25,0%
PTL UEH	>25,0%	22,5%
PTL EH	>25,0%	15,0%
GEL EHU	>25,0%	15,0%
GEL HU	-	-
GEL UEH	>25,0%	17,5%
GEL EH	-	-
ROU EHU	>25,0%	<10,0%
ROU HU	-	-
ROU UEH	>25,0%	20,0%
ROU EH	25,0%	15,0%

\*\*FB – fibra de colágeno; FP – fibra de colágeno em pó; PEP – colágeno hidrolisado 2; PTL – colágeno hidrolisado 1; GEL – gelatina 1; ROU – gelatina 2. HU – hidrólise por ultrassom; EH – hidrólise enzimática; EHU – hidrólise enzimática com ultrassom concomitante; UEH – tratados previamente com ultrassom e posterior hidrólise enzimática. \* Amostras contidas de “-“ em seus resultados, não solubilizaram para realização da análise.

## IV. CAPÍTULO

### 6. ARTIGO III

(Artigo formatado de acordo com a revista Ultrasonic Sonochemistry)

**Efeitos da hidrólise enzimática (pepsina) assistida por ultrassom  
nas propriedades funcionais e estruturais de hidrolisados de  
diferentes colágenos bovinos**

## **Efeitos da hidrólise enzimática (pepsina) assistida por ultrassom nas propriedades funcionais e estruturais de hidrolisados de diferentes colágenos bovinos**

### **RESUMO**

Foram avaliados os efeitos da hidrólise enzimática (pepsina) assistida por ultrassom nas propriedades funcionais e estruturais de hidrolisados de diferentes colágenos bovinos. Foram avaliadas as características estruturais (espectroscopia na região do infravermelho com transformada de Fourier), grau de hidrólise, atividade antioxidante e atividade antimicrobiana. A utilização do ultrassom prévio ou concomitante a hidrólise enzimática potencializou a ruptura estrutural das amostras fibra, gelatina 1 e gelatina 2. A hidrólise enzimática gerou maior quantidade de bandas em número de onda ( $\text{cm}^{-1}$ ). A concentração de proteína dos hidrolisados da amostra fibra variou de 7,01 a 5,48 mg/mL. O tratamento que possibilitou maior atividade antioxidante para a amostra fibra foi com a utilização de 4% de enzima e ultrassom concomitante (40,7%), com grau de hidrólise de 21,7%. Para a amostra fibra pó o tratamento de hidrólise com uso de 4% de enzima resultou em menor teor de proteína (6,97 mg/mL), maior grau de hidrólise (19,9%) e maior atividade antioxidante (38,6%). As amostras comerciais, hidrolisado 2 e hidrolisado 1, tratadas com ultrassom apresentaram maior atividade antioxidante, sendo de 49,8% e de 41,1%, respectivamente, comparado aos demais tratamentos. Para a amostra comercial gelatina 1 o teor de proteína variou de 6,58 a 5,25 mg/mL e para a amostra gelatina 2 de 6,74 a 5,30 mg/mL. A maior atividade antioxidante encontrada para gelatina 1 foi de 43,9% e para gelatina 2 foi de 53,7%, com grau de hidrólise correspondente de 1,16 e 0,47%, respectivamente, sendo referente ao tratamento de hidrólise com apenas o uso do ultrassom. Os hidrolisados mostraram capacidade inibitória mínima contra a bactéria gram-negativa *Salmonella choleraesuis* e gram-positiva *Staphylococcus aureus*. A atuação dos hidrolisados foi favorecida pela melhor ligação do peptídeo com a membrana celular bacteriana, causando a inibição dos micro-organismos. Pode-se concluir que a hidrólise enzimática concomitante ou não ao uso do ultrassom apresentou aumento da funcionalidade das amostras fibra e fibra pó, para as demais amostras sua utilização como tratamento complementar a hidrólise não foi interessante, devido aos piores resultados de atividade antioxidante encontrados. Porém, proporcionou maior extensão de hidrólise protéica.

**Palavras-chave:** Pepsina, grau de hidrólise, atividade antioxidante, atividade antimicrobiana, FTIR, ultrassom.

## 1. INTRODUÇÃO

O colágeno pode ser encontrado sob diversas formas em tecidos de organismos multicelulares, sendo a proteína dominante no tecido conjuntivo, podendo desempenhar diversas funções de acordo com sua localização [1]. O colágeno representa cerca de 30% de toda a matéria orgânica do corpo de animais [2]. As proteínas são moléculas altamente funcionais, sendo sua funcionalidade vinculada a sua estrutura molecular, responsável por suas interações [3]. O crescente interesse pelo processo de obtenção, fracionamento e caracterização de colágenos e seus derivados [4] se deve às propriedades funcionais desses compostos e a possibilidade de utilização como substituintes de agentes sintéticos nos mais diversos processos industriais [5].

A hidrólise enzimática de colágeno, obtido de subprodutos do abate de bovinos, com proteases animais, vegetais e microbianas [5-7] possibilita a obtenção de peptídeos, agregando valor a esses resíduos [6, 8]. Os peptídeos bioativos exercem determinadas atividades biológicas, entre elas atividade antimicrobiana, antioxidante e anti-hipertensiva [9-11], quando são liberados por processo de hidrólise química ou enzimática [4, 8].

Os tipos de peptídeos bioativos gerados a partir de uma determinada proteína dependem de dois fatores: a sequência primária da proteína do substrato e a especificidade da enzima utilizada para gerar tais peptídeos [12]. As enzimas proteolíticas são classificadas como endo e exopeptidases. As exopeptidases são responsáveis pela remoção sistemática de aminoácidos do N-terminal ou no C-terminal ou pela hidrólise de peptídeos nas ligações terminais. Já as endopeptidases, de forma aleatória, hidrolisam as ligações peptídicas nas moléculas de proteína, produzindo peptídeos relativamente grandes [13].

Estudos mostraram que o ultrassom pode modificar as propriedades funcionais e estruturais das proteínas alimentares [14]. Contudo, esta modificação estrutural depende da natureza da proteína, do grau de desnaturação e de agregação [15]. O ultrassom leva a modificações nas proteínas e na atividade enzimática, proporcionando o aumento da atividade, o qual ocorre pela melhor ligação substrato-enzima e exposição do sítio ativo da enzima. Entretanto, a aplicação do ultrassom no processo enzimático pode causar efeitos adversos à conformação da enzima e prejudicar a sua atividade no processo de hidrólise.

As diferenças entre os diversos tipos de subprodutos de colágeno (gelatina, fibra e colágeno hidrolisado) e a avaliação dos efeitos da hidrólise enzimática (pepsina) assistida por

ultrassom nas propriedades funcionais e estruturais dos hidrolisados proteicos ainda foi pouco explorada, o que permite um amplo campo a ser estudado. O objetivo deste estudo foi avaliar os efeitos da hidrólise enzimática (pepsina) assistida por ultrassom nas propriedades funcionais e estruturais de hidrolisados de diferentes colágenos bovinos.

## 2. MATERIAIS E MÉTODOS

Diferentes colágenos bovinos foram utilizados para obtenção dos hidrolisados proteicos, sendo apresentados na **Tabela 1**. A enzima Pepsina 1:2,500 (powder,  $\geq 400$  units/mg protein, P7125, SIGMA<sup>®</sup>) e os demais reagentes de grau analítico (PA) foram adquiridos da empresa Sigma-Aldrich Brasil Ltda (São Paulo, SP, Brasil).

### 2.1 Tratamentos de obtenção dos hidrolisados de colágeno

Os diferentes tratamentos utilizados para obtenção dos hidrolisados protéicos de colágeno bovino podem ser evidenciados na **Tabela 2**.

Para condução das reações enzimáticas foi utilizada metodologia descrita por Lin *et al.* [16] com modificações, onde foram testados 4% de enzima pepsina em relação ao substrato proteico. Para realizações das reações de hidrólise fez-se o uso dos seguintes equipamentos: banho ultratermostático (Modelo SL152, potência de 2000 W, SOLAB, Piracicaba, SP, Brasil), banho ultrassônico (Modelo ECO-SONICS – Q3.8/40A, potência de 88 W e frequência de 40 KHz, ULTRONIQUE, SERVYLAB, São Leopoldo, RS, Brasil) e centrífuga COLEMAN (Modelo 90 – 1, Santo André, SP, Brasil). Os hidrolisados foram liofilizados (liofilizador TERRONI, Modelo LS3000, São Carlos, SP, Brasil).

Para o tratamento EHU o tempo total de processo de hidrólise foi de três horas, enquanto para o tratamento UEH foi de cinco horas. A temperatura utilizada quando do uso do ultrassom foi de  $52 \pm 2,5$  °C.

### 2.2 Caracterização estrutural dos hidrolisados de colágeno

A análise de FTIR foi realizada de acordo com a metodologia descrita por Demiate *et al.* [17]. Para análise foi utilizado espectrofotômetro no infravermelho com transformada de Fourier (FTIR) Shimadzu IR-21 Prestige (Shimadzu Corporation, Kyoto, Japão). Os espectros foram recolhidos na faixa de  $4.000 - 400$   $\text{cm}^{-1}$ . As pastilhas foram produzidas através da mistura de 100 mg de KBr e 2 mg de amostra liofilizada, sendo prensados em hidráulica Carver.

### **2.3 Determinação do grau de hidrólise dos hidrolisados de colágeno**

A metodologia descrita por Lowry *et al.* [18] foi utilizada para determinar o grau de hidrólise dos hidrolisados. A albumina bovina (Sigma-Aldrich Brasil Ltda, São Paulo, SP, Brasil) foi utilizada como padrão para o método. A proteína dos colágenos brutos foi utilizada como base para calcular o grau de hidrólise.

### **2.4 Determinação da atividade antioxidante dos hidrolisados de colágeno**

Para avaliar a atividade antioxidante dos hidrolisados foi utilizado o método DPPH de Brand-Willians *et al.* [19] modificado por Sánchez-Moreno *et al.* [20]. Foi utilizado espectrofotômetro UV para realização da análise (Modelo UV-M51, BEL Photonics, SERVYLAB, São Leopoldo, RS, Brasil).

### **2.5 Determinação da atividade antimicrobiana dos hidrolisados de colágeno**

A Concentração Inibitória Mínima (CIM) foi determinada pelo método indireto de crescimento bacteriano em meio de cultura líquido [21].

A determinação da CIM foi realizada sobre bactéria Gram-negativa (*Salmonella choleraesuis* - ATTC 10708) e Gram-positiva (*Staphylococcus aureus* - ATTC 6538), as quais foram previamente crescidas em caldo Luria Bertani (10 g/L triptona, 5 g/L extrato de levedura, 5 g/L NaCl) a 37 °C por 24 horas. Após o período de crescimento das culturas, foram inoculadas, em micro placas de fundo chato, 10 µL de pré-inóculo de cada bactéria ( $10^8$  UFC.mL<sup>-1</sup>) em um volume final de 300 µL de caldo LB com as diferentes concentrações das formulações de hidrolisados de colágeno previamente diluídas (15 a 30%). Posteriormente, as micro-placas foram incubadas a 35 °C por 24 horas em agitador eletromagnético (60 Hz).

Antes e após o período de incubação, 0 e 24 horas respectivamente, realizou-se a leitura da micro placa, utilizando-se o leitor automático de micro placas (Bio-TecInstruments Inc., modelo EL800), com comprimento de onda pré-selecionado de 490 nm. A Concentração Inibitória Mínima foi determinada como a menor concentração de hidrolisado de colágeno que não gerou alteração na turbidez, obtida pela diferença entre as leituras realizadas em 24 e 0 horas.

### **2.6 Avaliação estatística**

Os espectros de FTIR, depois de coletados, foram suavizados (15 pontos), a linha de base foi corrigida, a zona de CO<sub>2</sub> removida e os dados foram normalizados usando o software

Shimadzu IRsolution 1.40. Em seguida, uma tabela com todos os dados foi construída, utilizando o número de onda nas colunas e as amostras nas linhas.

Uma abordagem quimiométrica, incluindo a análise de componentes principais (PCA), foi implementada no Pirouette v. 4.0 (Infometrix<sup>®</sup>, Bothell, WA, EUA). A análise foi realizada na região do espectro compreendendo de 500 a 1722 centímetros<sup>-1</sup>, e o conjunto de dados foi centrado na média e submetido à primeira derivada.

A PCA é uma técnica de redução de dados, a qual foi aplicada para verificar diferenças entre as amostras e extrair informações importantes dos espectros da FTIR. Foi construído um gráfico de dispersão tridimensional para projetar as amostras [22].

Para avaliar os resultados de proteína (Lowry), grau de hidrólise (Lowry) e atividade antioxidante (DPPH) foram realizados dois experimentos:

O Experimento 1 avaliou qual aplicação do ultrassom, previamente ou concomitante, foi melhor ao tratamento enzimático. Efetuou-se análise do experimento em parcelas subdivididas (*split plot*) com delineamento inteiramente casualizado, sendo os diferentes colágenos distribuídos nas parcelas e a aplicação de ultrassom (prévio vs. concomitante) e suas interações distribuídas ao acaso nas subparcelas dentro de cada parcela, conforme o modelo estatístico (Eq. 1):

$$Y_{ijk} = \mu + \alpha_i + (\alpha\gamma)_{ik} + \beta_j + (\alpha\beta)_{ij} + \varepsilon_{ijk} \quad [1]$$

em que,  $Y_{ijk}$  = valor observado na  $i$ -ésima parcela,  $k$ -ésima repetição e  $j$ -ésima subparcela;  $\mu$  = média geral da variável resposta;  $\alpha_i$  = efeito fixo do  $i$ -ésimo colágeno;  $(\alpha\gamma)_{ik}$  = efeito residual das parcelas (erro A);  $\beta_j$  = efeito fixo da  $j$ -ésima aplicação do ultrassom;  $(\alpha\beta)_{ij}$  = efeito fixo da interação entre o  $i$ -ésimo colágeno e a  $j$ -ésima aplicação do ultrassom;  $\varepsilon_{ijk}$  = efeito residual das subparcelas (erro B) ou efeito aleatório associado a  $ijk$ -ésima observação, suposto  $\varepsilon_{ijk} \stackrel{iid}{\sim} N(0, \sigma^2)$ .

O Experimento 2 avaliou o efeito do colágeno, da concentração enzimática e da aplicação ou não de ultrassom concomitante. Efetuou-se análise do experimento em parcelas subdivididas (*split plot*) com delineamento inteiramente casualizado, sendo os diferentes colágenos distribuídos nas parcelas e as concentrações de enzimas (0 e 4%) e aplicação ou não de ultrassom (sem US vs. com US concomitante) e suas interações distribuídas ao acaso nas subparcelas dentro de cada parcela, conforme o modelo estatístico descrito na Eq. 2:

$$Y_{ijkl} = \mu + \alpha_i + (\alpha\delta)_{il} + \beta_j + \gamma_k + (\beta\gamma)_{jk} + (\alpha\beta)_{ij} + (\alpha\gamma)_{ik} + (\alpha\beta\gamma)_{ijk} + \varepsilon_{ijkl} \quad [2]$$

em que,  $Y_{ijkl}$  = valor observado na  $i$ -ésima parcela,  $l$ -ésima repetição e  $jk$ -ésima subparcela;  $\mu$  = média geral da variável resposta;  $\alpha_i$  = efeito fixo do  $i$ -ésimo colágeno;  $(\alpha\delta)_{il}$  = efeito residual das parcelas (erro A);  $\beta_j$  = efeito fixo da  $j$ -ésima concentração enzimática;  $\gamma_k$  = efeito fixo da  $k$ -ésima aplicação do ultrassom;  $(\beta\gamma)_{jk}$  = efeito fixo da interação entre a  $j$ -ésima concentração enzimática e a  $k$ -ésima aplicação do ultrassom;  $(\alpha\beta)_{ij}$  = efeito fixo da interação entre o  $i$ -ésimo colágeno e a  $j$ -ésima concentração enzimática;  $(\alpha\gamma)_{ik}$  = efeito fixo da interação entre o  $i$ -ésimo colágeno e a  $k$ -ésima aplicação do ultrassom;  $(\alpha\beta\gamma)_{ijk}$  = efeito fixo da interação entre o  $i$ -ésimo colágeno, a  $j$ -ésima concentração enzimática e  $k$ -ésima aplicação do ultrassom;  $\varepsilon_{ijkl}$  = efeito residual das subparcelas (erro B) ou efeito aleatório associado a  $ijkl$ -ésima observação, suposto  $\varepsilon_{ijkl} \stackrel{iid}{\sim} N(0, \sigma^2)$ .

Os dados foram sujeitos a investigação de *outliers* a partir dos resíduos estudentizados. Posteriormente, foram submetidos à análise de variância univariada (ANOVA) pelo procedimento GLM, suas médias ajustadas pelo método dos quadrados mínimos ordinários como comando LSMEANS e comparadas pela diferença mínima significativa (teste t) ao nível de 5% de significância. Além disso, foi realizada análise de correlação de Spearman entre as variáveis estudadas.

As análises estatísticas foram executadas no aplicativo SAS<sup>®</sup> System for Windows<sup>™</sup> versão 9.4 (SAS Institute Inc., Cary - NC, USA).

### 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

#### 3.1 Caracterização estrutural dos hidrolisados

Os espectros das amostras FP HU, FB HU, GEL UEH e GEL EHU não foram utilizados na análise de componentes principais (PCA), devido a sua baixa qualidade. Estas amostras apresentaram alta higroscopicidade, aglomerando-se facilmente, formando massas compactas e difíceis de serem desfeitas. Isso prejudicou a homogeneização das amostras no KBr, resultando em sinais muito fracos ou até mesmo a saturação destes.

Através da análise de componentes principais (PCA) pode-se verificar que as amostras foram separadas em três grupos distintos, considerando a similaridade das bandas (**Fig. 1**), explicando 82,94% da variância dos dados. Os hidrolisados FP EH, FP UEH e FP EHU ficaram no mesmo grupo, agrupando-se no 1º quadrante, expondo que os tratamentos de hidrólise para esta amostra geraram estruturas com níveis vibracionais semelhantes.

As amostras de hidrolisados ROU EH, GEL EH, FB EH, FB UEH e FB EHU agruparam-se no 2º quadrante, ficando no mesmo grupo. Podendo-se inferir que essas amostras apresentaram bandas em número de onda ( $\text{cm}^{-1}$ ) semelhantes, ou seja, sofreram hidrólise em ligações específicas, gerando estruturas proteicas suscetíveis as mesmas frequências de vibrações moleculares específicas. Enquanto PTL UEH, PTL EHU, PTL EH, PTL HU, PEP EH, PEP UEH, PEP EHU, PEP HU, ROU UEH, ROU HU, ROU EHU e GEL HU agruparam-se no 3º quadrante.

As amostras de hidrolisados comerciais, PEP e PTL, para todos os tratamentos (HU, EH, EHU, UEH), se encontraram no mesmo grupo, mostrando que, independente do tipo de tratamento, as estruturas geradas foram semelhantes. Este resultado pode ser justificado em virtude da enzima pepsina ser mais utilizada em processos de extração de colágeno devido sua agressividade sobre as proteínas, sendo assim, pode atuar sobre as diferentes estruturas: quaternária, terciária, secundária e primária, podendo até mesmo gerar aminoácidos livres.

As gelatinas, ROU e GEL, quando foram tratadas só com ultrassom ou com este concomitante e previamente a hidrólise enzimática se localizaram no mesmo grupo, enquanto as tratadas com hidrólise enzimática se encontraram em outro, mostrando que a enzima e o ultrassom apresentaram atividades distintas frente as estruturas proteicas das amostras.

Wolf *et al.* [23] realizaram a caracterização físico-química de fibras de colágeno e colágeno em pó para a produção de filmes autocompostos. Verificaram que os espectros de FTIR obtidos para ambas as amostras foram muito semelhantes e sugeriram que o processo utilizado para transformação das fibras de colágeno em pó não alterou a estrutura química das proteínas.

A utilização do ultrassom prévio ou concomitante a hidrólise enzimática potencializou a ruptura estrutural das amostras FB, GEL e ROU. A hidrólise enzimática gerou maior quantidade de bandas em número de onda ( $\text{cm}^{-1}$ ).

Os resultados evidenciam que cada tipo de colágeno requer um tratamento específico de hidrólise, pois cada amostra possui diferentes propriedades, decorrentes dos diferentes processos de extração. Também se pode verificar que a enzima utilizada no processo de hidrólise atua de formas distintas dependendo das condições impostas a ela, como o pH, temperatura, relação enzima/substrato, tipo de substrato e a forma de utilização do ultrassom ao processo de hidrólise.

### 3.2 Efeitos da utilização do ultrassom prévio ou concomitante sobre a hidrólise enzimática

O efeito do colágeno foi significativo ( $p < 0,0001$ ) para as variáveis proteína (ptn), grau de hidrólise (GH) e atividade antioxidante (AA), mostrando que os resultados obtidos para essas análises dependeram não somente do processo de hidrólise aplicado, mas também do tipo de amostra testada (**Tabela 3**). O ultrassom e a interação colágeno x ultrassom não foram significativos ( $p > 0,05$ ) no processo de hidrólise enzimática, ou seja, a utilização do ultrassom prévio ou concomitante não resultou em diferença significativa sobre as variáveis estudadas.

Houve correlação positiva ( $p < 0,05$ ) entre grau de hidrólise e atividade antioxidante ( $r = 0,41$ ), mostrando que são dependentes (**Tabela 4**), onde maiores valores de grau de hidrólise podem afetar a atividade antioxidante do hidrolisado positivamente ou negativamente, dependendo do processo e amostra testada. A variável proteína não apresentou correlação ( $p > 0,05$ ) com as demais variáveis. García-Moreno *et al.* [24], relatam que seus hidrolisados apresentaram importante inibição do radical DPPH quando o grau de hidrólise foi maior. Peptídeos de cadeia de menor tamanho são considerados potenciais agentes antioxidantes [25, 26], além de serem considerados imodificáveis durante a digestão, podendo ser absorvidos através do trato gastrointestinal e produzir ações biológicas específicas [27].

A utilização do ultrassom prévio ou concomitante ao processo de hidrólise enzimática proporcionou resultados semelhantes para as variáveis analisadas (**Tabela 5**). Pode-se concluir que o ultrassom não inibiu a atividade da enzima quando utilizado concomitante a hidrólise (dentro das condições testadas). Podemos afirmar que isso é uma particularidade da pepsina a qual pode ser ativada pelo uso do ultrassom, devido ao aumento de combinações entre substrato e enzima [28, 29]. Resultado semelhante foi encontrado por Yu *et al.* [29], os quais verificaram que a aplicação de ultrassom ( $278,8 \pm 7,4$  W, 40 kHz) durante 30-60 minutos, sob temperatura controlada de 0 a 4 °C, ativou a atividade da enzima pepsina. Efeito atribuído as modificações na sua estrutura secundária e terciária. Esses mesmos autores, também estudaram o efeito do ultrassom na atividade da enzima tirosinase e encontraram aumento de sua atividade, justificada pela facilitação da ligação substrato-enzima e exposição do sítio ativo da enzima [28].

O ultrassom utilizado previamente ao processo de hidrólise (comparado ao concomitante) também não melhorou a atividade da enzima. Resultado contrário foi encontrado por Knezevic-Jugovic *et al.* [30], onde a combinação de ultrassom prévio (1 hora, 30 kHz, pH 8,3) e a posterior hidrólise enzimática com alcalase (50 °C e pH 8,0) aumentou a atividade antioxidante dos hidrolisados de proteínas da clara do ovo.

A utilização do ultrassom previamente ou concomitante ao processo de hidrólise leva ao rompimento de estruturas terciárias e quaternárias das proteínas, facilitando a interação substrato-enzima, todavia pode causar efeitos adversos à conformação da enzima e sua atividade [31]. Gosset *et al.* [32] relatam que o pH utilizado durante o processo de isolamento de proteínas pode influenciar no valor de grau de hidrólise do isolado protéico, pois ele pode modificar a estrutura da proteína e dificultar a ação de enzimas. O pH e a força iônica alteram a distribuição das cargas das cadeias laterais das proteínas [32].

Para avaliar o efeito dos diferentes tipos de colágeno, da enzima e do ultrassom sobre as diferentes variáveis analisadas foi escolhido o processo com o uso do ultrassom concomitante. A hidrólise enzimática com ultrassom concomitante é mais viável e econômica comparada à hidrólise com ultrassom prévio e posterior adição da enzima.

### **3.3 Efeitos do ultrassom (sem e com), da enzima (0 e 4%) e dos diferentes tipos de colágeno sobre o teor de proteína, grau de hidrólise e atividade antioxidante**

O efeito do colágeno, enzima e interação colágeno x enzima foi significativo ( $p < 0,001$ ) para as variáveis proteína (ptn), grau de hidrólise (GH) e atividade antioxidante (AA), mostrando que os resultados dependem do tipo de colágeno e da concentração de enzima utilizada no processo de hidrólise enzimática (**Tabela 6**). O efeito do ultrassom, como era esperado, não foi significativo ( $p > 0,05$ ) na hidrólise enzimática das amostras. O efeito da interação enzima x ultrassom, colágeno x ultrassom e colágeno x enzima x ultrassom só foi significativo ( $p < 0,05$ ) para a variável atividade antioxidante, ou seja, esses três fatores determinaram os resultados obtidos para esta análise.

Houve correlação negativa ( $p < 0,001$ ) entre teor de proteína residual e grau de hidrólise ( $r = -0,41$ ), onde maiores teores de proteína resultaram em menores graus de hidrólise, isso se deve a menor quebra durante o processo de hidrólise (**Tabela 7**).

Os valores de proteínas foram menores e de grau de hidrólise maiores para as amostras de FB tratadas com 4% de enzima pepsina, devido à maior ruptura da estrutura protéica do colágeno (**Tabela 8**). Efeito observado também por Guerard *et al.* [33], que relataram o aumento do grau de hidrólise quando utilizado uma protease neutra comercial na hidrólise de resíduos de atum.

O teor de proteína residual dos hidrolisados (média por colágeno) obtidos pelas diferentes concentrações de enzima variou de 4,81 a 7,96 mg/mL e o grau de hidrólise de 5,29 a 10,3%. No estudo realizado por García-Moreno *et al.* [24] com o intuito de avaliar 15 hidrolisados diferentes, foi verificado que os hidrolisados provenientes de carapau (*horse*

*mackerel*) apresentaram os maiores graus de hidrólise (18,2 a 21,0%), valores maiores do que os obtidos para hidrolisados de músculo de tubarão gato (*small-spotted catshark*) (17,3 a 19,2%), de hidrolisados de goraz (*axillary seabream*) (16,0 a 17,2%) e de hidrolisados de sardinha (13,2 a 14,9%).

A liberação de peptídeos com capacidade antioxidante não está apenas relacionada com as propriedades do substrato, escolha do tratamento enzimático e com as condições do processo (pH, temperatura e relação enzima/substrato), mas também, com a extensão da reação de hidrólise [34]. O melhor tratamento para obtenção de maior atividade antioxidante para amostra FB foi com a utilização de 4% de enzima e ultrassom concomitante, mostrando que a atuação mutua da enzima e do ultrassom provocou maior ruptura protéica favorecendo o aumento da funcionalidade do hidrolisado obtido dessa amostra (**Tabela 9**). A amostra de hidrolisado de carapau (*horse mackerel*) de García-Moreno *et al.* [24] apresentou atividade de eliminação de radicais DPPH entre 35 e 45%, dependendo do tipo de tratamento empregado ((A) duas horas de hidrólise com subtilisina seguido de duas horas de hidrólise com tripsina; (B) duas horas de reação com tripsina seguida por duas horas de incubação com subtilisina e; (C) quatro horas de hidrólise com adição simultânea de ambas as enzimas).

A fibra de colágeno é obtida do couro bovino, tratado com hidróxido de cálcio, passa pelo processo de desengorduramento e posterior secagem, resultando em longas cadeias de polipeptídeos. A enzima pepsina atua sobre ligações peptídicas de aminoácidos muito grandes [35] e o ultrassom atua sobre ligações de hidrogênio e interações hidrofóbicas, rompendo estruturas terciárias e quaternárias das proteínas devido aos efeitos de cavitação. Essas modificações estruturais possibilitam o acesso da enzima à estrutura, causando um aumento no grau de hidrólise [31]. A utilização apenas de hidrólise enzimática ou de ultrassom não geraram peptídeos funcionais (com atividade antioxidante) quanto à hidrólise ácida e com uso de temperatura (sem enzima e ultrassom). García-Moreno *et al.* [24] relatam que a atividade antioxidante depende do tratamento enzimático e da amostra utilizada. Amostras de hidrolisados com baixa atividade antioxidante e considerável grau de hidrólise são decorrentes da geração máxima, em curto período, de peptídeos com atividade de eliminação de radicais DPPH, em seguida esses são hidrolisados em sequências inativas. Por outro lado, dependendo do substrato usado no processo de hidrólise, a geração de peptídeos com poder de captura de radicais DPPH pode ser continuamente produzida por ação enzimática.

A FP é obtida por processo similar ao da FB, entretanto é submetida a temperaturas mais elevadas e passa por posterior processo de moagem, sofrendo tratamento mais drástico. Para essa amostra o tratamento de hidrólise que possibilitou menor teor de proteína, maior

grau de hidrólise e maior atividade antioxidante foi o com uso de 4% de enzima. A pepsina teve boa atuação frente ao substrato, gerando peptídeos funcionais. A atividade antioxidante encontrada por Bernardini *et al.* [36] para hidrolisado de proteínas sarcoplasmáticas da carne de peito bovino foi de  $18,68 \pm 2,78\%$ , utilizando o método de análise DPPH.

A utilização de enzima e ultrassom concomitante no processo de hidrólise da amostra FP gerou baixo valor de atividade antioxidante (15,0%), provavelmente a enzima e o ultrassom frente a esse substrato tenham atuado sobre estruturas e ligações diferentes e gerado peptídeos de baixa funcionalidade. Por isso, é de extrema importância ter conhecimento da amostra utilizada no processo de hidrólise, pois os resultados esperados são influenciados diretamente pelas mesmas e decorrentes dos tratamentos e processos de obtenção destas.

As amostras de colágeno hidrolisado, PEP e PTL são derivadas do colágeno nativo, extraído de peles e ossos de animais através de hidrólise química e enzimática, apresentando massas moleculares de 500 a 25.000 Da. Os hidrolisados das amostras PTL e PEP apresentaram valores similares de atividade antioxidante para os tratamentos de hidrólise enzimática e hidrólise enzimática assistida por ultrassom. Devido a essas amostras já se tratarem de hidrolisados a utilização de enzima e ultrassom frente às mesmas afetou negativamente a atividade antioxidante, provavelmente por terem hidrolisado drasticamente a estrutura dos peptídeos, podendo até terem causado a formação de radicais livres durante a hidrólise, esses reagem com a proteína causando a oxidação ou ainda levaram a formação de sequência de peptídeos inativos. O grau de hidrólise está relacionado com a atividade específica da enzima. A maior atividade da enzima resulta em maior quebra das proteínas em peptídeos menores, todavia a quebra exagerada ou descontrolada pode prejudicar a funcionalidade dos hidrolisados [37].

As amostras PEP e PTL tratadas com ultrassom apresentaram os maiores valores de atividade antioxidante. No estudo realizado por Klompong *et al.* [38] foi relatado que a atividade sequestradora de radicais DPPH por hidrolisados de músculo de Trevally (*Selaroides leptolepis*) usando as enzimas flavourzyme e alcalase foi aumentada quando o grau de hidrólise diminuiu. Resultado contrário foi encontrado por You *et al.* [39] que encontraram maior atividade de eliminação de radicais DPPH quando o grau de hidrólise aumentou. Os peptídeos de diferentes hidrolisados diferem em termos de comprimento de cadeia e de sequência de aminoácidos, contribuindo para a variação da capacidade de captura dos radicais DPPH [40].

As gelatinas GEL e ROU são amostras parcialmente hidrolisadas em meio alcalino (tratamento drástico), com massas moleculares próximas a 100.000 Da. Resultados parecidos

de proteína foram encontrados para as amostras GEL e ROU, levando em consideração que as amostras são provenientes de tratamentos de extração semelhantes e são gelatinas do tipo B.

O maior valor de atividade antioxidante encontrado para GEL foi de 43,9% e para ROU foi de 53,7%, sendo referente ao tratamento de hidrólise com apenas o uso do ultrassom. Quando a amostra ROU foi tratada com enzima apresentou maior valor de grau de hidrólise, entretanto a atividade antioxidante foi inferior quando da utilização de enzima no processo. O grau de hidrólise é determinado pelas condições de processo (relação enzima/substrato, tempo, temperatura e pH) e influenciado pela natureza da atividade enzimática [41]. Isso evidencia que nem sempre maior grau de hidrólise vai resultar em maior atividade antioxidante, pois o que determina a maior funcionalidade do hidrolisado é a formação de peptídeos de alto poder de captura de radicais livres.

Os tratamentos de hidrólise enzimática com ultrassom concomitante e hidrólise enzimática foram benéficos, avaliando a variável atividade antioxidante, apenas para as amostras FB e FP, respectivamente, as quais são amostras estruturalmente maiores. Para as amostras com menores cadeias de aminoácidos a hidrólise com a enzima pepsina não foi interessante, mesmo essa assistida por ultrassom, provavelmente por ter quebrado a estrutura dessas amostras em locais inadequados para a liberação de peptídeos de alta funcionalidade, podendo ter gerado peptídeos muito pequenos ou até mesmo aminoácidos livres ou inativos. O tratamento de hidrólise utilizando apenas o ultrassom proporcionou as amostras comerciais já hidrolisadas (PEP e PTL) e parcialmente hidrolisadas (GEL e ROU) maiores valores de atividade antioxidante.

As amostras, de forma geral, não apresentaram boa atividade antioxidante, apesar de terem apresentado valor de grau de hidrólise significativo. Isso pode ser justificado pelo fato da enzima pepsina ser normalmente utilizada no processo de extração de colágeno, pois extrai com maior facilidade a fração colagenosa do substrato, é uma enzima agressiva a proteína.

### **3.4 Resultados da atividade antimicrobiana**

Praticamente todos os hidrolisados apresentaram atividade antimicrobiana adequada para inibir o crescimento da bactéria Gram-negativa *Salmonella choleraesuis*, sendo necessária uma concentração de amostra menor que 10%, com exceção das amostras FB HU, FP HU, GEL HU (não solubilizaram) e PTL EHU (17,5%), PTL UEH (15%), PTL EH (20%) (**Tabela 10**).

Para a inibição da bactéria Gram-positiva *Staphylococcus aureus* as amostras que necessitaram de porcentagem maior que 10% foram FB HU, FP HU, GEL HU (não

solubilizaram) e PEP UEH (22,5%), as demais necessitaram de concentração menor que 10% para inibir o crescimento da bactéria. Provavelmente a ação dos hidrolisados foi favorecida pela melhor ligação do peptídeo com a membrana celular bacteriana, causando a inibição dos micro-organismos.

No estudo realizado por Soares [42], hidrolisados proteicos de torta de soja obtidos por hidrólise enzimática realizada com pepsina, apresentaram atividade antimicrobiana contra *S. Enteritidis*, *L. monocytogenes*, *S. aureus*, *B. cereus*, *S. Brasil* e *E. coli*. Os componentes presentes nesses hidrolisados atuaram melhor contra as bactérias Gram-positivas (*S. aureus*, *L. monocytogenes* e *B. cereus*).

Giuliani *et al.* [43] relataram que peptídeos com atividade antimicrobiana são pequenos, com massa molecular abaixo de 10 kDa [44]. Apresentam carga positiva e são compostos de molécula anfipática (apresentam regiões hidrofóbicas e hidrofílicas) [43]. A permeação do peptídeo depende da sequência de aminoácidos, da composição da membrana lipídica e da concentração de peptídeo [45].

Os hidrolisados apresentaram atividade antimicrobiana, apresentando potencial de aplicação em produtos alimentícios com esta finalidade.

#### 4. CONCLUSÃO

A utilização do ultrassom prévio ou concomitante a hidrólise enzimática potencializou a ruptura estrutural das amostras fibra, gelatina 1 e gelatina 2. A hidrólise enzimática gerou maior quantidade de bandas em número de onda ( $\text{cm}^{-1}$ ).

Os tratamentos de hidrólise enzimática com ultrassom concomitante e hidrólise enzimática proporcionaram as amostras fibra e fibra pó, respectivamente, menor teor de proteína, maior grau de hidrólise e maior atividade antioxidante. O tratamento de hidrólise apenas com ultrassom possibilitou maior atividade antioxidante para as amostras comerciais de hidrolisado 1, hidrolisado 2, gelatina 1 e gelatina 2, mesmo tendo resultado em baixo grau de hidrólise. Podendo inferir que nem sempre maior grau de hidrólise resulta em maior atividade antioxidante. A amostra que apresentou maior atividade antioxidante foi à gelatina 2. Os hidrolisados mostraram inibição contra a bactéria Gram-negativa *Salmonella choleraesuis* e a Gram-positiva *Staphylococcus aureus*. A atuação dos hidrolisados foi favorecida pela melhor ligação do peptídeo com a membrana celular bacteriana, causando a inibição dos micro-organismos, podendo ser utilizados no desenvolvimento de produtos alimentícios com essa finalidade.

Diante disso, pode-se concluir que a hidrólise enzimática com ultrassom concomitante ou não só foi favorável para a funcionalidade das amostras fibra e fibra pó, para as demais amostras sua utilização como tratamento de hidrólise não foi interessante devido aos baixos resultados de atividade antioxidante encontrados. Entretanto, proporcionou para todas as amostras maior rompimento estrutural. Para futuras pesquisas, onde o objetivo for a obtenção de peptídeos para dietas parenterais, enriquecimento de meio ou suplementação alimentar, ou até mesmo obtenção de aminoácidos, o uso da enzima pepsina e do ultrassom concomitante como processo de hidrólise seria interessante, entretanto, para este estudo, onde o objetivo foi aumentar a funcionalidade dos hidrolisados, a utilização dos mesmos concomitantemente não foi interessante.

## 5. AGRADECIMENTOS

A FAPERGS e ao CNPQ pela ajuda financeira para aquisição de equipamentos e de reagentes, como também de bolsas de iniciação científica. As empresas Novaprom e Rousselot pela doação das amostras utilizadas nesse estudo. A Universidade Estadual de Ponta Grossa e a Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e das Missões pela ajuda com as análises de espectroscopia na região do infravermelho com transformada de Fourier e antimicrobianas. Ao Edital Capes nº 27/2010 – Pró – Equipamentos Institucional pela possibilidade de utilização do liofilizador. A Universidade Federal de Santa Maria pela infraestrutura disponibilizada e pelas bolsas de iniciação científica concedidas. A CAPES pela bolsa de pós-graduação e ao Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos.

## 6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] Z.Y. Liu, A.C.M. Oliveira & Y.C. Su, Characterization of pepsin-solubilized collagen from skin and connective tissue of giant red sea cucumber (*Parastichopus californicus*), *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 58 (2010) 1270–1274.
- [2] F. Pati, B. Adhikari & S. Dhara, Isolation and characterization of fish scale collagen of higher thermal stability, *Bioresource Technology*, 101 (2010) 3737-3742.
- [3] E.A. Foegeding & J.P. Davis, Food protein functionality: A comprehensive approach, *Food Hydrocolloids*, 25(8) (2011) 1853–1864.
- [4] E.A. Decker & Y. Park, Healthier meat products as functional foods, *Meat Science*, 86 (2010) 49-55.

- [5] M.C. Gómez-Guillén, B. Giménez, M.E. López-Caballero & M.P. Montero, Functional and bioactive properties of collagen and gelatin from alternative sources: A review, *Food Hydrocolloids*, 25 (2011) 1813-1827.
- [6] J.D. Webster, D.A. Ledward & R.A. Lawrie, Protein hydrolysates from meat industry by-products, *Meat Science*, 7 (1982) 147-157.
- [7] M.I. Khan, M.S. Arshad, F.M. Anjum, A. Sameen, A. Rehman & W. Gill, Meat as a functional food with special reference to probiotic sausages, *Food Research International*, 44 (2011) 3125-3133.
- [8] R.D. Bernardini, P. Harnedy, D. Bolton, J. Kerry, E. O'Neill, A.M. Mullen & M. Hayes, Antioxidant and antimicrobial peptidic hydrolysates from muscle protein sources and by-products, *Food Chemistry*, 134 (2011) 1296-1307.
- [9] B. Li, F. Chen, X. Xang, B. Ji & Y. Wu, Isolation and identification of antioxidative peptides from porcine collagen hydrolysate by consecutive chromatography and electrospray ionization-mass spectrometry, *Food Chemistry*, 102 (2007) 1135-1143.
- [10] S.K. Kim, H.G. Byun, P.J. Park & F. Shahidi, Angiotensin I-converting enzyme inhibitory peptides purified from bovine skin gelatin hydrolysate, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49 (2001) 2992-2997.
- [11] G. Herregods, J. Camp, M. Morel, B. Ghesquiere, K. Gevaert, L. Vercruyssen, et al. Angiotensin I-converting enzyme inhibitory activity of gelatin hydrolysates and identification of bioactive peptides, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 59 (2011) 552-558.
- [12] P.A. Harnedy & R. J. Fitzgerald, Bioactive peptides from marine processing waste and shellfish: A review, *Journal of Functional Foods*, 4 (2012) 6-24.
- [13] A. Clemente, Enzymatic protein hydrolysates in human nutrition, *Trends in Science & Technology*, 11 (2000) 254-262.
- [14] J. Chandrapala, B. Zisu, M. Palmer, S. Kentish & M. Ashokkumar, Effects of ultrasound on the thermal and structural characteristics of proteins in reconstituted whey protein concentrate, *Ultrasonics Sonochemistry*, 18(5) (2011) 951-957.
- [15] C. Arzeni, K. Martínez, P. Zema, A. Arias, O.E. Pérez & A.M.R. Pilosof, Comparative study of high intensity ultrasound effects on food proteins functionality, *Journal of Food Engineering*, 108(3) (2012a) 463-472.
- [16] L. Lin, S. Lv & B. Li, Angiotensin-I-converting enzyme (ACE)-inhibitory and antihypertensive properties of squid skin gelatin hydrolysates, *Food Chemistry*, 131 (2012) 225-230.

- [17] I.M. Demiate, N. Dupuy, J.P. Huvenne, M.P. Cereda, & G. Wosiacki, Relationship between baking behavior of modified cassava starches and starch chemical structure determined by FTIR spectroscopy, *Carbohydrate Polymers*, 42 (2000) 149-158.
- [18] O.H. Lowry, N.J. Rosebrough, A.L. Farr & R.J. Randall, Protein measurement with the folin phenol reagent, *Journal of Biological Chemistry*, 193 (1951) 265-75.
- [19] W. Brand-Williams, M.E. Cuvelier & C. Berset, Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity, *Food Science and Technology*, 28 (1995) 25-30.
- [20] C. Sanchez-Moreno, J.A. Larrauri & F. Saura-Calixto, A procedure to measure the antiradical efficiency of polyphenols, *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 76(2) (1998) 270-276.
- [21] I. Gaio, A.G. Saggiorato, H. Treichel, A.J. Cichoski, V. Astolfi, R.I. Cardoso, G. Toniazzo, E. Valduga, N. Paroul & R.L. Cansian, Antibacterial activity of basil essential oil (*Ocimum basilicum* L.) in Italian-type sausage, *Journal für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit*, 10(4) (2015) 323-329.
- [22] A. A. F. Zielinski, C. W. I. Haminiuk, C. A. Nunes, E. Schnitzler, S. M. Van Ruth & D. Granato, Chemical composition, sensory properties, provenance, and bioactivity of fruit juices as assessed by chemometrics: A critical review and guideline, *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 13(3) (2014) 300-316.
- [23] K.L. Wolf, P.J.A. Sobral & V.R.N. Telis, Physicochemical characterization of collagen fibers and collagen powder for self-composite film production, *Food Hydrocolloids*, 23 (2009) 1886–1894.
- [24] P.J. García-Moreno, I. Batista, C. Pires, N.M. Bandarra, F.J. Espejo-Carpio, A. Guadix & E.M. Guadix, Antioxidant activity of protein hydrolysates obtained from discarded Mediterranean fish species, *Food Research International*, 65 (2014) 469-476.
- [25] Y.J. Jeon, H.G. Byun & S.K. Kim, Improvement of functional properties of cod frame protein hydrolysates using ultrafiltration membranes, *Process Biochemistry*, 35(2000) 471-478.
- [26] S.K. Kim, Y.T. Kim, H.G. Byun, K.S. Nam, D.S. Joo & F. Shahidi, Isolation and characterization of antioxidative peptides from gelatin hydrolysate of Alaska Pollack skin, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49(2001) 1984-1989.
- [27] P.R. Roberts, J.D. Burney, K.W. Black & G.P. Zaloga, Effect of chain length on absorption of biologically active peptides from the gastrointestinal tract, *Digestion*, 60(1999) 332-337.

- [28] Z. Yu, W. Zeng & X. Lu, Influence of ultrasound to the activity of tyrosinase. *Ultrasonics Sonochemistry*, 20 (2013) 805-809.
- [29] Z.L. Yu, W.C. Zeng, W.H. Zhang, X.P. Liao, B. Shi, Effect of ultrasound on the activity and conformation of  $\alpha$ -amylase, papain and pepsin, *Ultrasonics Sonochemistry*, 21 (2014) 930-936.
- [30] Z. Knezevic-Jugovic, A. Stefanovic, M. Zuza, S. Milovanovic, S. Jakovetic, V. Manojlovic & B. Bugarski, Effects of sonication and high-pressure carbon dioxide processing on enzymatic hydrolysis of egg white proteins, *Acta Periodica Technologica*, 43 (2012) 33-41.
- [31] C. Ozuna, I.P. Martínez, E. C. Tostado, L. Ozimek, S. L. Amaya-Llano, Innovative applications of high-intensity ultrasound in the development of functional food ingredients: Production of protein hydrolysates and bioactive peptides, *Food Research International*, 77 (2015) 685-696.
- [32] P.W. Gosset, S.S.H. Rizvi, R.C. Baker, Qualitative analysis of gelation in egg protein systems, *Food Technology*, 38 (5) (1984) 67-74.
- [33] F. Guerard, L. Guimas & A. Binet, Production of tuna waste hydrolysates by a commercial neutral protease preparation, *Journal of Molecular Catalysis B-Enzymatic*, 19 (2002) 489-498.
- [34] D. Laroque, A. Chabeaud & F. Guérard, Antioxidant capacity of marine protein hydrolysates, In J. P. Bergé (Ed.), *Added value to fisheries waste* (pp. 147–161). Kerala: Transworld Research Network (2008).
- [35] G.J. Maximo & R.L. Cunha, Mechanical properties of collagen fiber and powder gels. *Journal of Textures Studies*, 41 (6) (2010) 842-862.
- [36] R.D. Bernardini, A.M. Mullen, D. Bolton, J. Kerry, E. O'Neill & M. Hayes, Assessment of the angiotensin-I-converting enzyme (ACE-I) inhibitory and antioxidant activities of hydrolysates of bovine brisket sarcoplasmatic proteins produced by papain and characterization of associated bioactive peptidic fractions, *Meat Science*, 90 (2012) 226-235.
- [37] H. G. Kristinsson & B. A. Rasco, Fish Protein Hydrolysates: Production, Biochemical, and Functional Properties, *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 40(1) (2000) 43-81.
- [38] V. Klompong, S. Benjakul, D. Kantachote, & F. Shahidi, Antioxidative activity and functional properties of protein hydrolysate of yellow stripe trevally (*Selaroides leptolepis*) as influenced by the degree of hydrolysis and enzyme type, *Food Chemistry*, 102 (4) (2007) 1317-1327.

- [39] L. You, M. Zhao, C. Cui, H. Zhao, and B. Yang, Effect of degree of hydrolysis on the antioxidant activity of loach (*Misgurnus anguillicaudatus*) protein hydrolysates, *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 10 (2) (2009) 235-240.
- [40] R. Balti, A. Bougatef, N.E.H. Ali, N. Ktari, K. Jellouli, N. Nedjar-Arroume, P. Dhulster & M. Nasri, Comparative study on biochemical properties and antioxidative activity of cuttlefish (*Sepia officinalis*) protein hydrolysates produced by alcalase and bacillus licheniformis NH<sub>1</sub> proteases, *Journal of Amino Acids*, 2011 (2011), Article ID 107179, 11 pages doi:10.4061/2011/107179.
- [41] D. Panyam & A. Kilara, Enchanting the functionality of food proteins by enzymatic modification, *Trends in Food Science and Technology*, 7 (4) (1996) 120-125.
- [42] N.B. Soares, Obtenção de hidrolisado proteico de torta de soja e avaliação de sua atividade antimicrobiana, Dissertação de mestrado, Programa de Pós-Graduação em Alimentos e Nutrição, Universidade Federal do Estado do Rio de Janeiro, 2013 (resultados não publicados).
- [43] A. Giuliani, G. Pirri & S. Nicoletto, Antimicrobial peptides: An overview of a promising class of therapeutics, *Central European Journal of Biology*, 2 (2007) 1-33.
- [44] S. Kim & I. Wijesekara, Development and biological activities of marine-derived bioactive peptides: A review, *Journal of Functional Foods*, 2 (2010) 1-9.
- [45] M. Zasloff, Antimicrobial peptides of multicellular organisms, *Nature*, 415 (2002) 389-395.

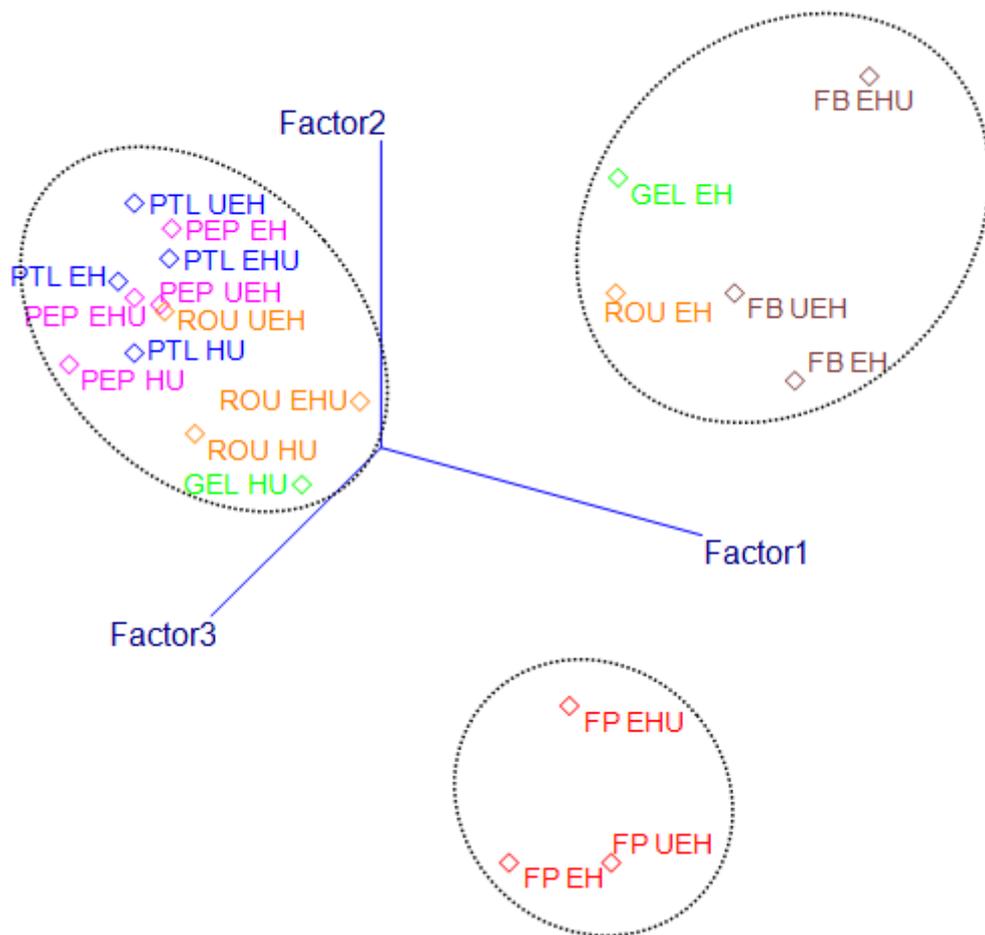
**Tabela 1** – Diferentes tipos de colágenos bovinos utilizados para obtenção dos hidrolisados proteicos.

<b>Tipo de colágeno</b>	<b>Descrição</b>	<b>Fabricante</b>	<b>Nome/Sigla</b>
Fibra natural	Tamanho de partícula entre 1,80 e 1,92 mm; Extraída de pele bovina por tratamento alcalino, pH entre 7 e 9,5	Novaprom Food Ingredients Ltda (Lins – SP - Brasil)	Fibra/FB
Fibra em pó	Tamanho de partícula entre 0,45 e 0,57 mm; Extraída de pele bovina por tratamento alcalino, pH entre 7 e 9,5	Novaprom Food Ingredients Ltda (Lins – SP- Brasil)	Fibra pó/FP
Gelatina 1	Extraída de couro ou de diversas matérias-primas por hidrólise parcial alcalina (tratamento drástico); 236 g de Bloom; 40 mP de viscosidade; 11% de umidade; pH 5,6; <= 2% de cinzas	Gelita do Brasil Ltda (Cotia – SP- Brasil)	Gelita <sup>®</sup> /GEL
Gelatina 2	Extraída de couro ou de diversas matérias-primas por hidrólise parcial alcalina (tratamento drástico); 250g de Bloom; 3,8 mP de viscosidade; 12,4% de umidade; pH 5,5; <=2% de cinzas	Rousselot Gelatinas do Brasil Ltda (Amparo – SP- Brasil)	Rousselot <sup>®</sup> /ROU
Hidrolisado 1	Extraído de couro bovino/ pele suína por hidrólise química + enzimática; 39 mP de viscosidade; 5,9% de umidade; 92,1% de proteínas; pH 5,7; <=2% de cinzas	Gelita do Brasil Ltda (Cotia – SP- Brasil)	Peptiplus <sup>®</sup> /PTL
Hidrolisado 2	Extraído de couro bovino/ pele suína por hidrólise química + enzimática; 4 mP de viscosidade; 7,2% de umidade; 92,15% de proteína; pH 6; 0,65% de cinzas	Rousselot Gelatinas do Brasil Ltda (Amparo – SP- Brasil)	Peptan B <sup>®</sup> /PEP

Fonte: [22-24].

**Tabela 2** – Tratamentos utilizados para obtenção dos hidrolisados proteicos de colágenos bovinos.

<b>Sigla</b>	<b>Descrição dos tratamentos</b>	<b>Enzima</b>	<b>Ultrassom</b>	<b>T °C</b>
CC	Colágenos brutos	Não	Não	45
HU	Hidrólise por ultrassom	Não	Sim	52 ± 2,5
EH	Hidrólise enzimática	Sim	Não	45
EHU	Hidrólise enzimática com ultrassom concomitante	Sim	Sim	52 ± 2,5
UEH	Tratados previamente com ultrassom e posterior hidrólise enzimática	Sim	Sim	52 ± 2,5



**Fig. 1** Dispersão tridimensional da parcela obtida pela PCA com base na região 500-1722  $\text{cm}^{-1}$ .

FB – fibra natural de colágeno; FP – fibra de colágeno em pó; PEP – colágeno hidrolisado 2; PTL – colágeno hidrolisado 1; GEL – gelatina 1; ROU – gelatina 2. HU – hidrólise por ultrassom; EH – hidrólise enzimática; EHU – hidrólise enzimática com ultrassom concomitante; UEH – tratados previamente com ultrassom e posterior hidrólise enzimática.

**Tabela 3** - Valores probabilísticos para avaliar o efeito do ultrassom prévio ou concomitante a hidrólise enzimática com pepsina sobre as variáveis proteína (mg/mL), grau de hidrólise (%), e atividade antioxidante (%).

<b>Efeitos</b>	<b>ptn</b>	<b>GH</b>	<b>AA</b>
<b>Colágeno</b>	0,0001	0,0001	0,0007
<b>Ultrassom</b>	0,9737	0,2511	0,5328
<b>Colágeno × Ultrassom</b>	0,0253	0,2136	0,1982
<b>Média</b>	5,45	15,7	28,1
<b>CV</b>	3,57	3,21	18,9

ptn – proteína; GH – grau de hidrólise e AA – atividade antioxidante. CV (%) – coeficiente de variação.

**Tabela 4** - Coeficientes de correlação de Spearman entre as variáveis proteína (mg/mL), grau de hidrólise (%) e atividade antioxidante (%) dos hidrolisados de colágeno.

	<b>ptn</b>	<b>GH</b>	<b>AA</b>
<b>ptn</b>		0,04 <sup>ns</sup>	-0,02 <sup>ns</sup>
<b>GH</b>			0,41*
<b>AA</b>			

ptn – proteína; GH – grau de hidrólise e AA – atividade antioxidante. <sup>ns</sup>Não significativo (p>0,05); \*Significativo (p<0,05); \*\*Significativo (p<0,01); \*\*\*Significativo (p<0,001).

**Tabela 5** – Médias totais de proteína, grau de hidrólise e atividade antioxidante para as amostras de hidrolisados de colágeno, avaliando o efeito do ultrassom na hidrólise enzimática.

	<b>Ultrassom</b>	
	<b>Prévio</b>	<b>Concomitante</b>
<b>Proteína, mg/mL</b>	5,56	5,56
<b>Grau de hidrólise, %</b>	15,0	16,5
<b>Atividade antioxidante, %</b>	27,9	26,7

Médias seguidas por letras minúsculas distintas na mesma linha diferem ( $p < 0,05$ ) entre ultrassom pelo teste “t”.

**Tabela 6** - Valores probabilísticos para avaliação do efeito do ultrassom (concomitante), da enzima (0 e 4%) e dos diferentes tipos de colágeno sobre as variáveis proteína (mg/mL), grau de hidrólise (%) e atividade antioxidante (%).

<b>Efeitos</b>	<b>p<sub>tn</sub></b>	<b>GH</b>	<b>AA</b>
<b>Colágeno</b>	0,0001	0,0001	0,0001
<b>Enzima</b>	0,0001	0,0001	0,0003
<b>Ultrassom</b>	0,7576	0,1717	0,5095
<b>Enzima × Ultrassom</b>	0,6720	0,2603	0,0316
<b>Colágeno × Enzima</b>	0,0001	0,0001	0,0001
<b>Colágeno × Ultrassom</b>	0,1965	0,1667	0,0018
<b>Colágeno × Enzima × Ultrassom</b>	0,3594	0,2362	0,0002
<b>Média</b>	6,07	8,80	31,45
<b>CV</b>	3,94	2,33	20,35

p<sub>tn</sub> – proteína; GH – grau de hidrólise e AA – atividade antioxidante. CV (%) – coeficiente de variação.

**Tabela 7** - Coeficientes da correlação de Spearman entre as variáveis proteína (mg/mL), grau de hidrólise (%) e atividade antioxidante (%) dos hidrolisados de colágeno.

	<b>ptn</b>	<b>GH</b>	<b>AA</b>
<b>ptn</b>		-0,41***	-0,03 <sup>ns</sup>
<b>GH</b>			-0,13 <sup>ns</sup>
<b>AA</b>			

ptn – proteína; GH – grau de hidrólise e AA – atividade antioxidante. <sup>ns</sup>Não significativo (p>0,05); \*Significativo (p<0,05); \*\*Significativo (p<0,01); \*\*\*Significativo (p<0,001).

**Tabela 8** – Médias de proteína e grau de hidrólise para as diferentes amostras de hidrolisados de colágenos bovinos.

Colágeno*	Enzima, %		Média colágeno	Enzima, %		Média colágeno
	0	4		0	4	
	Proteína, mg/mL			Grau de hidrólise, %		
<b>FB</b>	7,00 <sup>aB</sup>	5,62 <sup>bA</sup>	6,31 <sup>B</sup>	0,60 <sup>b</sup>	19,8 <sup>aA</sup>	10,2 <sup>A</sup>
<b>FP</b>	8,70 <sup>aA</sup>	7,22 <sup>bB</sup>	7,96 <sup>A</sup>	1,15 <sup>b</sup>	18,9 <sup>aA</sup>	10,1 <sup>A</sup>
<b>PEP</b>	5,62 <sup>aD</sup>	4,96 <sup>bB</sup>	5,29 <sup>D</sup>	0,00 <sup>b</sup>	10,6 <sup>aC</sup>	5,29 <sup>C</sup>
<b>PTL</b>	5,12 <sup>aE</sup>	4,51 <sup>bB</sup>	4,81 <sup>E</sup>	2,06 <sup>b</sup>	13,7 <sup>aB</sup>	7,88 <sup>B</sup>
<b>GEL</b>	6,58 <sup>aC</sup>	5,34 <sup>bC</sup>	5,96 <sup>C</sup>	0,58 <sup>b</sup>	18,9 <sup>aA</sup>	9,75 <sup>AB</sup>
<b>ROU</b>	6,77 <sup>aBC</sup>	5,37 <sup>bD</sup>	6,07 <sup>BC</sup>	0,23 <sup>b</sup>	20,4 <sup>aA</sup>	10,3 <sup>A</sup>
<b>Média enzima</b>	6,63	5,50		0,77	17,1	

\*FB – fibra de colágeno; FP – fibra de colágeno em pó; PEP – colágeno hidrolisado 2; PTL – colágeno hidrolisado 1; GEL – gelatina 1; ROU – gelatina 2. Médias seguidas por letras minúsculas distintas na mesma linha diferem ( $p < 0,05$ ) entre enzima pelo teste “t”. Médias seguidas por letras maiúsculas distintas na mesma coluna diferem ( $p < 0,05$ ) entre colágeno pelo teste “t”.

**Tabela 9** – Médias de atividade antioxidante para as diferentes amostras de hidrolisados de colágenos bovinos.

Colágeno**	Enzima, %	US conc*		Média enzima	Média colágeno
		Sem	Com		
<b>Atividade antioxidante, %</b>					
FB	0	33,4	16,5 <sup>B</sup>	24,9	29,1 <sup>C</sup>
	4	25,9 <sup>b</sup>	40,7 <sup>aA</sup>	33,3	
Média ultrassom		29,6	28,6		
FP	0	17,7 <sup>B</sup>	14,6	16,2	21,5 <sup>D</sup>
	4	38,6 <sup>aA</sup>	15,0 <sup>b</sup>	26,8	
Média ultrassom		28,2	14,8		
PEP	0	38,8 <sup>b</sup>	49,8 <sup>aA</sup>	44,3	31,5 <sup>BC</sup>
	4	17,4	20,0 <sup>B</sup>	18,7	
Média ultrassom		28,1	34,9		
PTL	0	23,5 <sup>b</sup>	41,1 <sup>a</sup>	32,3	30,7 <sup>BC</sup>
	4	27,6	30,6	29,1	
Média ultrassom		25,5	35,8		
GEL	0	36,8	43,9 <sup>A</sup>	40,4	36,7 <sup>AB</sup>
	4	38,7 <sup>a</sup>	27,5 <sup>bB</sup>	33,1	
Média ultrassom		37,7	35,7		
ROU	0	42,6 <sup>b</sup>	53,7 <sup>aA</sup>	48,2	38,1 <sup>A</sup>
	4	28,1	28,0 <sup>B</sup>	28,1	
Média ultrassom		35,4	40,8		
Média geral ultrassom		30,7	31,8		

\*\*FB – fibra de colágeno; FP – fibra de colágeno em pó; PEP – colágeno hidrolisado 2; PTL – colágeno hidrolisado 1; GEL – gelatina 1; ROU – gelatina 2. \*US conc – ultrassom concomitante. Médias seguidas por letras minúsculas distintas na mesma linha diferem ( $p < 0,05$ ) entre ultrassom pelo teste “t”. Médias seguidas por letras maiúsculas distintas na mesma coluna diferem ( $p < 0,05$ ) entre enzima ou colágeno pelo teste “t”.

**Tabela 10** - Concentração Inibitória Mínima (CIM), dos diferentes hidrolisados de colágeno, necessária para inibição da bactéria Gram-negativa (*Salmonella choleraesuis* - ATTC 10708) e Gram-positiva (*Staphylococcus aureus* - ATTC 6538).

Hidrolisados de colágeno**	Bactérias	
	<i>Salmonella choleraesuis</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>
FB EHU	<10,0%	<10,0%
FB HU	-	-
FB UEH	<10,0%	<10,0%
FB EH	<10,0%	<10,0%
FP EHU	<10,0%	<10,0%
FP HU	-	-
FP UEH	<10,0%	<10,0%
FP EH	<10,0%	<10,0%
PEP EHU	<10,0%	<10,0%
PEP HU	<10,0%	<10,0%
PEP UEH	<10,0%	22,5%
PEP EH	<10,0%	<10,0%
PTL EHU	17,5%	<10,0%
PTL HU	<10,0%	<10,0%
PTL UEH	15,0%	<10,0%
PTL EH	20,0%	<10,0%
GEL EHU	<10,0%	<10,0%
GEL HU	-	-
GEL UEH	<10,0%	<10,0%
GEL EH	<10,0%	<10,0%
ROU EHU	<10,0%	<10,0%
ROU HU	<10,0%	<10,0%
ROU UEH	<10,0%	<10,0%
ROU EH	<10,0%	<10,0%

\*\*FB – fibra de colágeno; FP – fibra de colágeno em pó; PEP – colágeno hidrolisado 2; PTL – colágeno hidrolisado 1; GEL – gelatina 1; ROU – gelatina 2. HU – hidrólise por ultrassom; EH – hidrólise enzimática; EHU – hidrólise enzimática assistida por ultrassom; UEH – tratados previamente com ultrassom e posterior hidrólise enzimática. \* Amostras contidas de “-“ em seus resultados, não solubilizaram para realização da análise.

## V. CAPÍTULO

### 7. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Através da caracterização físico-química dos diferentes colágenos foi possível verificar que estes são ricos em proteínas. A obtenção dos hidrolisados de diferentes colágenos bovinos foi possível através da utilização de diferentes tratamentos de hidrólise, onde, dependendo da amostra, da utilização do ultrassom e do tipo de enzima foi obtido resultados distintos para as variáveis analisadas.

As enzimas atuaram sobre diferentes estruturas proteicas nas hidrólises, variando de acordo com o tipo de amostra e condições do meio, principalmente, a forma de aplicação do ultrassom. O ultrassom potencializou a hidrólise estrutural das amostras de colágenos bovinos, gerando maior quantidade de bandas em número de onda ( $\text{cm}^{-1}$ ). A FTIR e a PCA se mostraram técnicas eficazes para avaliação e diferenciação estrutural dos hidrolisados de diferentes colágenos bovinos, caracterizando-os de acordo com suas semelhanças espectrais.

Foi possível avaliar o grau de hidrólise, a atividade antioxidante e antimicrobiana dos hidrolisados, onde os resultados obtidos mostraram boa funcionalidade. Os tratamentos de hidrólise realizados para estudo da ação da enzima pepsina e do ultrassom proporcionaram menor média de proteína residual (pela análise de Lowry). Os maiores valores de grau de hidrólise foram obtidos com os tratamentos de hidrólise utilizando a enzima Flavourzyme<sup>®</sup> e o ultrassom concomitante à hidrólise enzimática. Maiores valores de grau de hidrólise não necessariamente geraram maiores valores de atividade antioxidante, devido à quebra excessiva da estrutura proteica, gerando peptídeos com baixa ou nenhuma funcionalidade.

Dentre todos os tratamentos de hidrólise utilizados para as três diferentes enzimas (Alcalase<sup>®</sup>, Flavourzyme<sup>®</sup> e pepsina), o que proporcionou maior atividade antioxidante às amostras fibra, hidrolisado 2, hidrolisado 1, gelatina 1 e gelatina 2 foi com o uso de ultrassom prévio seguido de hidrólise enzimática com 16% de enzima Alcalase<sup>®</sup>, sendo de 56,1, 59,1, 64,9, 66,2 e 64,3%, respectivamente. Já para a amostra fibra pó foi o tratamento com uso de ultrassom concomitante a hidrólise enzimática utilizando 8% de enzima Alcalase<sup>®</sup> (53,6%). Estes valores de atividade antioxidante são similares ou comparáveis com os de extratos de origem vegetal, representando o potencial de uso destes hidrolisados.

Os hidrolisados obtidos da hidrólise enzimática com pepsina concomitante ou não ao uso do ultrassom foram os que mostraram maior potencial de inibição das bactérias

*Salmonella choleraesuis* e *Staphylococcus aureus*, podendo estes serem utilizados no desenvolvimento de produtos alimentícios com esta finalidade.

Cada diferente enzima se destacou para uma propriedade analisada, onde, dependendo do objetivo pretendido (menor estrutura peptídica, aminoácidos livres, atividade antioxidante e antimicrobiana) a utilização destas junto ao seu tratamento de destaque é indicada. Para o presente estudo o principal objetivo foi aumentar a funcionalidade dos hidrolisados, sendo assim, o tratamento com melhores resultados foi com a enzima Alcalase<sup>®</sup> (16%) e ultrassom prévio, este proporcionou maiores valores de atividade antioxidante.

## **8. SUGESTÃO DE TRABALHOS FUTUROS**

Purificação, análise de peso molecular (eletroforese em gel de poliacrilamida) e sequenciamento dos aminoácidos dos hidrolisados de diferentes colágenos bovinos. Testar os hidrolisados em diferentes produtos alimentícios com o intuito de avaliar suas diferentes propriedades demonstradas neste trabalho. Analisar a atividade dos hidrolisados contra a enzima conversora da angiotensina-I (ECA-I). Avaliar o efeito da sonda de ultrassom juntamente a enzima pepsina na hidrólise das amostras testas visando obtenção de aminoácidos livres, podendo estes serem utilizados na suplementação alimentar. Avaliar o efeito da combinação de diferentes enzimas na hidrólise de colágenos.

## APÊNDICES

**Apêndice I:** Certificado de submissão do artigo intitulado:

Ultrasound effect on the functional and structural properties of hydrolysates of different bovin collagenes.

---

**From:** ees.ultson.0.3b104a.346b3083@eesmail.elsevier.com  
<ees.ultson.0.3b104a.346b3083@eesmail.elsevier.com> on behalf of Ultrasonics Sonochemistry <ultson@elsevier.com>  
**Sent:** Wednesday, August 3, 2016 10:59 AM  
**To:** rosacrisprestesdornelles@outlook.com  
**Subject:** A manuscript number has been assigned: ULTSON-D-16-00639

Ms. Ref. No.: ULTSON-D-16-00639  
Title: Ultrasound effect on the functional and structural properties of hydrolysates of different bovin collagenes  
Ultrasonics Sonochemistry

Dear Dr. ROSA CRISTINA PRESTES DORNELLES,

Your submission "Ultrasound effect on the functional and structural properties of hydrolysates of different bovin collagenes" has been assigned manuscript number ULTSON-D-16-00639.

To track the status of your paper, please do the following:

1. Go to this URL: <http://ees.elsevier.com/ultson/>
2. Enter your login details
3. Click [Author Login]  
This takes you to the Author Main Menu.
4. Click [Submissions Being Processed]

Thank you for submitting your work to Ultrasonics Sonochemistry.

Kind regards,

Ultrasonics Sonochemistry