

UNIVERSIDADE TECNOLÓGICA FEDERAL DO PARANÁ

KARINA PINHEIRO MARTINS

**AVALIAÇÃO DE RENDIMENTO, CAPACIDADE ANTIOXIDANTE E AÇÃO
INIBITÓRIA DE ACETILCOLINESTERASE POR HIDROLISADOS DE
CARTILAGEM ESTERNAL DE FRANGO**

CAMPO MOURÃO

2023

KARINA PINHEIRO MARTINS

**AVALIAÇÃO DE RENDIMENTO, CAPACIDADE ANTIOXIDANTE E AÇÃO
INIBITÓRIA DE ACETILCOLINESTERASE POR HIDROLISADOS DE
CARTILAGEM ESTERNAL DE FRANGO**

**Evaluation of Yield, Antioxidant Capacity, and Inhibitory Action of
Acetylcholinesterase by Chicken Sternal Cartilage Hydrolysates**

Dissertação, apresentada ao programa de Pós-Graduação em Tecnologia de Alimentos da Universidade Tecnológica Federal do Paraná, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Tecnologia de Alimentos.

Orientadora: Prof^ª. Dr^ª. Fernanda Vitória Leimann.

Coorientador: Prof. Dr. Rafael Porto Ineu.

CAMPO MOURÃO

2023



[4.0 Internacional](https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/)

Esta licença permite remixe, adaptação e criação a partir do trabalho, para fins não comerciais, desde que sejam atribuídos créditos ao(s) autor(es) e que licenciem as novas criações sob termos idênticos. Conteúdos elaborados por terceiros, citados e referenciados nesta obra não são cobertos pela licença.



KARINA PINHEIRO MARTINS

AVALIAÇÃO DE RENDIMENTO, CAPACIDADE ANTIOXIDANTE E AÇÃO INIBITÓRIA DE ACETILCOLINESTERASE POR HIDROLISADOS DE CARTILAGEM ESTERNAL DE FRANGO

Trabalho de pesquisa de mestrado apresentado como requisito para obtenção do título de Mestra Em Tecnologia De Alimentos da Universidade Tecnológica Federal do Paraná (UTFPR). Área de concentração: Tecnologia De Alimentos.

Data de aprovação: 17 de Março de 2023

Fernanda Vitoria Leimann, - Universidade Tecnológica Federal do Paraná

Angela Maria Gozzo, - Universidade Tecnológica Federal do Paraná

Dra. Livia Bracht, Doutorado - Universidade Estadual de Maringá (Uem)

Documento gerado pelo Sistema Acadêmico da UTFPR a partir dos dados da Ata de Defesa em 17/03/2023.

CAMPO MOURÃO

2023

AGRADECIMENTOS

A Deus, pela Sua presença em todos os momentos.

Aos professores Dr^a. Fernanda Vitória Leimann e Dr. Rafael Porto Ineu, pela orientação, confiança, paciência e apoio. MUITÍSSIMO obrigada por compartilharem seus conhecimentos e contribuírem para minha formação.

Ao meu avô Moysés Pinheiro de Freitas (In Memoriam), que em vida sempre me incentivou e deu suporte para que me dedicasse e evoluísse nos estudos. Tenho certeza que hoje, lá do céu, ele está no maior orgulho devido à conclusão desse programa.

À minha irmã Caroline, pelo carinho, pela cumplicidade e por sempre me encorajar e estar ao meu lado.

À minha mãe, pelo amor incondicional, pelo apoio, pelas orações infinitas, e à minha segunda mãe, Vó Clélia, obrigada pelas orações, motivação e carinho.

Ao meu namorado Márcio, pelo amor, companheirismo, paciência, e acima de tudo, incentivo.

A toda minha família, materna e paterna, pelo amor e apoio incondicional, amo todos vocês.

Aos meus colegas de mestrado, professores, técnicos de laboratório e toda equipe do programa e da universidade pelo suporte e apoio.

À Dra. Thaysa Moya, em especial, pela ajuda e suporte na realização deste trabalho.

A todos que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho, muito obrigada. Desejo poder ter sido merecedora do esforço dedicado por vocês em todos os aspectos.

A mente que se abre a uma nova
ideia jamais voltará ao seu tamanho
original.
(Albert Einstein)

RESUMO

Durante o processamento industrial de frangos, são obtidos subprodutos como a cartilagem esternal, que é fonte de colágeno. Entre os produtos de alto valor agregado que podem ser gerados a partir do colágeno, estão os hidrolisados de proteínas (HPs), derivados da hidrólise de ligações peptídicas de proteínas que resultam em aminoácidos livres e peptídeos de diferentes tamanhos. Devido a essa característica, os HPs têm demonstrado potencial para diversas propriedades bioativas, como antioxidante e modulação enzimática. Nestas funções, a inibição da enzima acetilcolinesterase (AChE) está relacionada à mitigação da incidência dos sintomas demenciais da doença de Alzheimer, e ainda faltam informações sobre a ação dos HPs em sua presença. Assim, o objetivo principal deste trabalho foi avaliar como os hidrolisados de cartilagem esternal de frango produzidos por hidrólise enzimática podem afetar a atividade da AChE. A cartilagem esternal de frango foi hidrolisada durante 4 horas (i- Alcalase®, pH 8,0, 50 ° C, 1,8% E: S; ii- Flavourzyme® (pH 7,0, 50 ° C, 1,8% E: S). Após a hidrólise, a solução foi submetida à inativação térmica (90 ° C / 15 min), seguida de centrifugação e liofilização do sobrenadante. Os resultados mostraram rendimentos de hidrólise iguais a 97,42% (Alcalase®) e 93,71% (Flavourzyme®), demonstrando maior capacidade de digestão do subproduto pela Alcalase®. Em relação à capacidade antioxidante, foram obtidos os seguintes resultados: DPPH 55,78 $\mu\text{mol}_{\text{ET}}\cdot\text{g}^{-1}$ (Alcalase®) e 53,18 $\mu\text{mol}_{\text{ET}}\cdot\text{g}^{-1}$ (Flavourzyme®); FRAP 12,20 $\mu\text{mol}_{\text{ET}}\cdot\text{g}^{-1}$ (Alcalase®) e 11,24 $\mu\text{mol}_{\text{ET}}\cdot\text{g}^{-1}$ (Flavourzyme®); ABTS 30,91 $\mu\text{mol}_{\text{ET}}\cdot\text{g}^{-1}$ (Alcalase®) e 31,18 $\mu\text{mol}_{\text{ET}}\cdot\text{g}^{-1}$ (Flavourzyme®); TBARS 55,89 $\mu\text{mol}_{\text{ET}}\cdot\text{g}^{-1}$ (Alcalase®) e 74,20 $\mu\text{mol}_{\text{ET}}\cdot\text{g}^{-1}$ (Flavourzyme®). A inibição da AChE pelos HPs foi igual a 37,05%, 45,57% e 60,65% para Alcalase® a 20, 30 e 40 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$, respectivamente, e 28,20%, 29,71% e 32,47% para Flavourzyme® nas mesmas concentrações. Isso demonstra o alto potencial da Alcalase® em hidrolisar a cartilagem esternal de frango, resultando em maior capacidade antioxidante, bem como na bioatividade de inibição da AChE. A análise do perfil de aminoácidos dos hidrolisados foi realizada por HPLC e foram identificados 18 aminoácidos (6 hidrofílicos e 12 hidrofóbicos), sendo que o teor de aminoácidos carregados positivamente corroborou com a maior ação de inibição da AChE pelo hidrolisado produzido com a Alcalase®.

Palavras-chave: Alcalase®; Flavourzyme®; AChE; Alzheimer; hidrólise enzimática.

ABSTRACT

During industrial chicken processing, by-products such as cartilage, a source of collagen, are obtained. Among the high-added-value products generated from collagen are the protein hydrolysates (PHs), derived from the hydrolysis of peptide bonds of proteins that result in free amino acids and peptides of different sizes. Due to this characteristic, PHs have demonstrated potential for several bioactive properties, such as antioxidant and enzyme modulation. The inhibition of acetylcholinesterase enzyme (AChE) is related to mitigating dementia symptoms, the incidence of Alzheimer's disease, and s. Still, there is a lack of information about PHs action for this purpose. Thus, the main objective of this work was to evaluate how cartilage hydrolysates produced by enzymatic hydrolysis could affect the AChE activity. The chicken sternal cartilage was hydrolyzed for 4 hours (i-Alcalase®, pH 8,0, 50°C, 1.8% E:S; ii-Flavourzyme®, pH 7,0, 50°C, 1.8%E:S). After hydrolysis, the solution was submitted to thermal inactivation (90°C/15 min), followed by centrifugation and lyophilization of the supernatant. Results showed hydrolysis yields equal to 97.42% (Alcalase®) and 93.71% (Flavourzyme®), demonstrating greater digestion capacity of the by-product by with Alcalase®. Concerning antioxidant capacity, the following results were obtained: DPPH 55.78 $\mu\text{mol}_{\text{ET}}\cdot\text{g}^{-1}$ (Alcalase®) and 53.18 $\mu\text{mol}_{\text{ET}}\cdot\text{g}^{-1}$ (Flavourzyme®); FRAP 12.20 $\mu\text{mol}_{\text{ET}}\cdot\text{g}^{-1}$ (Alcalase®) and 11.24 $\mu\text{mol}_{\text{ET}}\cdot\text{g}^{-1}$ (Flavourzyme®); ABTS 30,91 $\mu\text{mol}_{\text{ET}}\cdot\text{g}^{-1}$ (Alcalase®) and 31,18 $\mu\text{mol}_{\text{ET}}\cdot\text{g}^{-1}$ (Flavourzyme®); TBARS 55,89 $\mu\text{mol}_{\text{ET}}\cdot\text{g}^{-1}$ (Alcalase®) and 74,20 $\mu\text{mol}_{\text{ET}}\cdot\text{g}^{-1}$ (Flavourzyme®). The AChE inhibition by the PHs was equal to 37.05%, 45.57%, and 60.65% for Alcalase® at 20, 30 and 40 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$, respectively, and 28.20%, 29.71%, and 32.47% for Flavourzyme® at the same concentrations. This demonstrates the high potential of Alcalase® in hydrolyzing the chicken sternal cartilage, resulting in higher antioxidant capacity, as well as, resulting in higher antioxidant capacity and AChE inhibition bioactivity. The analysis of the amino acid profile of the hydrolysates was performed by HPLC and 18 amino acids were identified (6 hydrophilic and 12 hydrophobic), and the amino acid content positively corroborated with the greater AChE influence action by the hydrolysate produced with Alcalase®.

Keywords: Alcalase®; Flavourzyme®; AChE; Alzheimer's disease; enzymatic hydrolysis.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Processo de formação, organização e estrutura de colágeno.....	14
Figura 2 - Transmissão da acetilcolina (ACh) por sinapse (transmissão colinérgica) e ação da acetilcolinesterase (AChE) sobre a acetilcolina	19

LISTA DE TABELAS

Tabela 1- Dados gerais levantados quanto condições de hidrólise a partir da literatura	17
Tabela 2 - Composição centesimal da cartilagem esternal de frango.....	26
Tabela 3- Rendimento e Grau de Hidrólise (GH) dos hidrolisados de cartilagem de frango obtidos por hidrólise enzimática com enzima Alcalase® e Flavourzyme®.....	27
Tabela 4 - Capacidade antioxidante: concentração equivalente em trolox por grama de amostra (DPPH, FRAP e ABTS) e porcentagem de inibição da peroxidação lipídica (cérebro de rato, TBARS) de soluções contendo 30 mg/mL de hidrolisado de cartilagem esternal de frango obtidos com Alcalase® e Flavourzyme®	29
Tabela 5 - Inibição de acetilcolinesterase (AChE) pelos hidrolisados de cartilagem de frango obtidos por hidrólise enzimática com enzima Alcalase® e Flavourzyme®	31
Tabela 6 - Perfil de aminoácidos das amostras de hidrolisado de cartilagem esternal de frango (g/100 g).....	33

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	9
2 OBJETIVOS	12
2.1 Objetivo geral	12
2.2 Objetivos específicos	12
3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	13
3.1. Cadeia Produtiva do Frango	13
3.2. Colágeno	14
3.3. Hidrolisados proteicos	16
3.4. Inibição Acetilcolinesterase e Alzheimer	18
4 MATERIAIS E MÉTODOS	21
4.1 Pré-tratamento da CEF	21
4.2 Análise de composição centesimal	21
4.3 Obtenção do hidrolisado proteico	21
4.4 Determinação do grau de hidrólise do Sobrenadante (GH)	22
4.5 Rendimento	22
4.6 Atividade antioxidante do hidrolisado	22
4.7 Inibição da atividade de AChE	24
4.8 Determinação do perfil de aminoácidos dos hidrolisados	25
4.9 Análises estatísticas	25
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	26
5.1 Composição centesimal	26
5.2 Rendimento e GH	27
5.3 Capacidade antioxidante	28
5.4 Inibição da acetilcolinesterase	31
5.5 Análise de Perfil de Aminoácidos	32
6 CONCLUSÕES FINAIS	36
REFERÊNCIAS	37

1 INTRODUÇÃO

Na indústria de produtos cárneos são produzidos resíduos considerados subprodutos, como ossos (duros e moles), tendões, sangue, órgãos internos e outros. Esses resíduos são parte não comestível da carne e não são úteis em produtos de carne processada. A utilização eficiente destes subprodutos desempenha um papel importante na economia, além de impactar diretamente na poluição ambiental. (AKRAM; ZHANG, 2020).

Especificamente na indústria de processamento de aves, a cartilagem esternal de frango é um subproduto que constitui uma fonte promissora de colágeno- tipo II (PHIPPS *et al.*, 2020). Os colágenos são categorizados em 29 subtipos, com os tipos I, II e III constituindo a maioria dos colágenos no corpo humano (MA *et al.*, 2021). No entanto, o colágeno não pode ser digerido de forma eficiente e absorvido pelo corpo humano devido ao seu grande peso molecular e estrutura de tripla hélice. Por outro lado, os peptídeos derivados do colágeno são capazes de melhorar sua biodisponibilidade através do colágeno. Para garantir excelente bioatividade, é essencial que o colágeno alcance os tecidos-alvo da forma mais eficiente possível, para ser altamente biodisponível. Como os peptídeos possuem tamanho molecular reduzido quando comparado ao colágeno, apresentam maior absorção pelo organismo. (LIN *et al.*, 2018)

O colágeno é convertido em hidrolisado por meio da extração a partir de diferentes fontes usando ácido e enzimas, que causam proteólise dos peptídeos naturais (HARRIS *et al.*, 2021). A hidrólise enzimática é uma escolha favorável para a produção de tais peptídeos bioativos, valorizando assim a cartilagem esternal de frango, resíduo do processamento de peito de frango, tanto pela produção deste produto de elevado valor agregado, bem como pela redução da poluição ambiental (LIN *et al.*, 2018).

Há inúmeros estudos sobre a influência significativa dos peptídeos bioativos nos processos metabólicos ou fisiológicos, com efeitos benéficos à saúde. Entende-se por peptídeos bioativos os fragmentos de sequências de aminoácidos encontrados em uma proteína com funções biológicas, mas com importante valor nutricional, vendo-se os mesmos na gelatina, soja entre outros (HALIM; YUSOF; SARBON, 2016; HAM *et al.*, 2020).

Quando consumidos, os peptídeos bioativos são então absorvidos pelas células da mucosa intestinal delgado durante o processo de digestão e, posteriormente, entram no sistema sanguíneo do sangue. Nesta etapa são capazes de influenciar e regular processos fisiológicos, exibindo muitos papéis benéficos importantes, pois controlam doenças e promovem a saúde. Neste sentido destacam-se a regulação da pressão arterial, imunidade inata melhorada, efeitos

anti-inflamatórios, redução do colesterol, redução de lipídios e propriedades anticoagulatórias (ONUH; ALUKO, 2019). Exemplos de estudos sobre a influência dos peptídeos bioativos podem ser vistos em Ahn, Lee e Je (2010), Halim, Yusof e Sarbon (2016), Akram e Zhang (2020), e outros.

A inibição de enzimas do sistema colinérgico por ação de compostos bioativos, como os peptídeos, é uma bioatividade investigada por muitos grupos de pesquisa, uma vez que tais enzimas estão associadas ao desenvolvimento da Doença de Alzheimer. Os doentes possuem baixo nível de acetilcolina (neurotransmissor) durante a transmissão colinérgica, resultando na interrupção da transmissão nervosa. Sabe-se que as enzimas acetilcolinesterase e a butirilcolinesterase desempenham papel fundamental no interrompimento da transmissão do impulso nervoso, pois são responsáveis pela hidrólise da acetilcolina em acetato e colina (LIU *et al.*, 2017; MENÉNDEZ-HELMAN *et al.*, 2015). Sendo assim, a inibição das enzimas colinesterases pode ser uma alternativa para o tratamento dessa doença (LIU *et al.*, 2017), e o uso de compostos bioativos com a finalidade de modular essas enzimas tem se mostrado promissor para a minimização de danos cognitivos (ROCHA *et al.*, 2018).

A ação de peptídeos obtidos a partir de hidrólise enzimática de proteínas frente à enzima AChE já foi avaliada por outros autores, de forma computacional e experimental. Yu *et al.* (2020) utilizando análise *in silico* (computacional) em seu trabalho a ação de inibição da AChE pelo hidrolisado de proteína de ova de peixe. A quebra simulada da proteína foi realizada pelo programa ExPASy PeptideCutter foi usado, prevendo as sequências peptídicas pela hidrólise com as enzimas tripsina e pepsina. Em seguida foram realizadas análises de docking molecular para identificar o nível de interação entre os di e tri-peptídeos gerados na simulação com a acetilcolinesterase. Os di e tri-peptídeos derivados da proteína de ova de peixe com maior interação com a AChE determinados na análise *in silico* foram sintetizados quimicamente e analisados *in vitro* para avaliação da inibição da AChE. A inibição de 50% da atividade enzimática igual a $43,32 \pm 1,22 \mu\text{M}$ foi então determinada para sequências de tri peptídeos. Em outra pesquisa, Min *et al.* (2017) demonstraram com experimentos em animais que peptídeos derivados de caseína bovina (hidrolisado com as proteases de origem microbiana, subtilisina, bacilolisina e com tripsina pancreática) são capazes de prevenir o declínio cognitivo na doença de Alzheimer em modelos de camundongos com diminuição da inflamação e estresse oxidativo. Em seu estudo, Zhao *et al.* (2016) prepararam hidrolisados de proteína de anchova (enzimas utilizadas na hidrólise: Alcalase, papaína e pancreatina) e avaliaram suas atividades antioxidante e atividade inibitória da acetilcolinesterase (AChE) *in vitro*, além de testes *in vivo* em camundongos com amnésia induzida por escopolamina. Os autores concluíram que houve

uma melhora significativa na memória dos camundongos pela ação dos peptídeos, indicando que a proteína de anchova é uma fonte potencial de peptídeos bioativos.

Até o momento não há avaliação da ação de peptídeos obtidos a partir da hidrólise enzimática da cartilagem esternal de frango como inibidores da enzima AChE. Desta forma, no presente projeto pretende-se avaliar o potencial bioativo destes peptídeos obtidos a partir do bioresíduo industrial, cartilagem esternal de frango (CEF).

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Hidrolisar proteínas a partir do bioresíduo industrial, cartilagem esternal de frango (CEF) e avaliar a bioatividade em termos de ação inibitória de acetilcolinesterase (AChE), como também, a atividade antioxidante.

2.2 Objetivos específicos

- Determinar a composição centesimal da cartilagem esternal de frango (CEF);
- Hidrolisar proteínas a partir do bioresíduo industrial CEF com Alcalase® e Flavourzyme® por motivos tecnológicos e de custo;
- Determinar o rendimento e grau de hidrólise dos hidrolisados proteicos;
- Identificar o perfil de aminoácidos dos hidrolisados por HPLC;
- Quantificar a bioatividade em termos de ação inibitória de acetilcolinesterase (AChE);
- Avaliar a atividade antioxidante por meio de métodos *in vitro* (FRAP, ABTS e DPPH) e *in vitro* (TBARS com cérebro de rato).

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 Cadeia produtiva do frango

Países que se destacam na produção de carne de aves como Estados Unidos, China e Brasil, são os principais responsáveis por atender à crescente demanda deste produto no mercado mundial. Apesar da crise econômica que vem sendo enfrentada pelo Brasil o setor de produção avícola não parece sofrer interferências, uma vez que a produção, exportação e o consumo interno de produtos avícolas tiveram significativo aumento nos últimos anos (ABPA, 2016).

Segundo o Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE, 2021), o abate de cabeças de frangos no Brasil atingiu 6,18 bilhões em 2021. O volume significa alta de 2,18% ou 169,87 milhões de cabeças a mais na comparação com o ano anterior. Com esse desempenho, o país registrou recorde da série histórica da Pesquisa Trimestral do Abate, que começou em 1997.

De acordo com Martins *et al.* (2009), a maior parcela dos subprodutos de frigoríficos é tradicionalmente transformada em produtos de baixo valor comercial, como farinha para fabricação de rações, sendo estas aplicações de baixo valor agregado maiores do que os volumes de exportação. Quando exportada a cartilagem esternal de frango é vendida para países do Oriente, os japoneses por exemplo, fazem uso culinário do produto.

O aproveitamento de subprodutos agroindustriais consolida-se como uma preocupação crescente das empresas, pois as questões ambientais estão diretamente relacionadas com a competitividade entre as empresas e o lucro (PADILHA *et al.*, 2005). Além disso, a busca por ganho de competitividade e redução de desperdícios tem se tornado uma constante para as empresas (MELO; ALCÂNTARA, 2009).

Em nível molecular, o aproveitamento de subprodutos de origem animal pode ser uma alternativa viável e lucrativa, pois as biomoléculas que constituem estes subprodutos podem ser recuperadas e aplicadas na indústria de alimentos, indústria de cosméticos, indústria farmacêutica, entre outros (FERRARO *et al.*, 2016).

Diferentes subprodutos de frango são conhecidos por conterem apreciável quantidade de biomoléculas, como proteínas, enzimas e lipídeos (OCKERMAN; HANSEN, 2000; RAJU *et al.*, 1997). Especificamente na indústria de processamento de aves, a cartilagem esternal de frango é um subproduto que constitui uma fonte promissora de colágeno- tipo II (PHIPPS *et al.*, 2020).

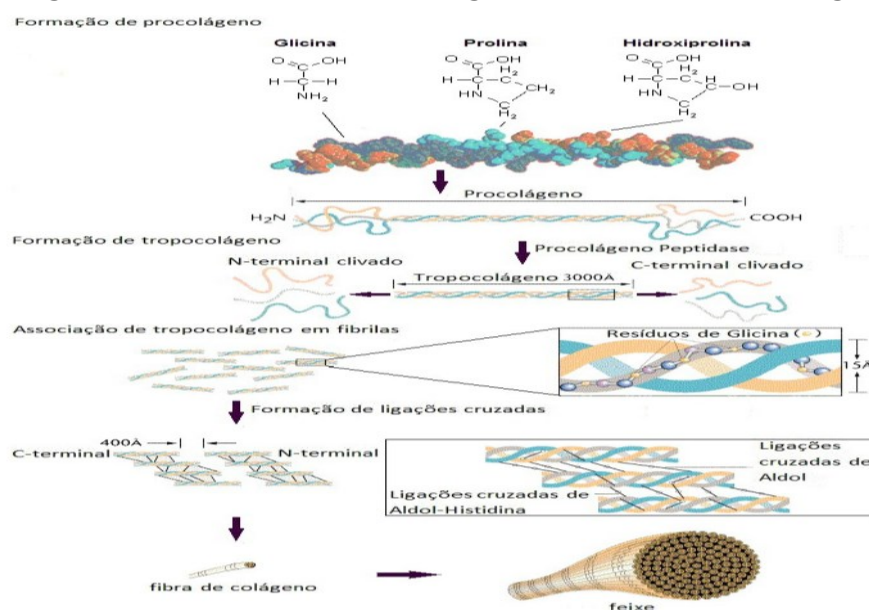
3.2 Colágeno

Colágenos são proteínas fibrosas encontradas em todos os animais multicelulares, sendo um importante componente das estruturas de apoio nos vertebrados e invertebrados. Nos mamíferos é a mais abundante proteína corporal, correspondendo a aproximadamente 25% em massa de todas as proteínas (DAMODARAN *et al.*, 2010), sendo a principal proteína constituinte da pele, tendões, cartilagem, ossos e dos tecidos em geral. (WARD; COURTS, 1977).

A molécula de colágeno tem cerca de 280 nm de comprimento, com massa molecular de 360.000 Da, é estabilizada por ligações de hidrogênio e por ligações intermoleculares (SILVA; PENNA, 2012) sendo composta por três cadeias polipeptídicas helicoidais, cada uma com cerca de 1.000 aminoácidos, a cadeia α . As cadeias se enovelam formando tripla hélice estável e de tamanho variado (NELSON; COX, 2004).

Na Figura 1 vê-se as moléculas de tripla hélice. O tamanho molecular (normalmente >700 Da) e a natureza hidrofílica (capacidade de ligação de H) dos peptídeos dificultam o processo de difusão e absorção na corrente sanguínea. Em geral, o uso de tecnologias como aplicação de temperatura e hidrólise do colágeno modifica sua estrutura molecular e permite que o organismo possa absorve-lo. O colágeno com estrutura molecular em partes menores, vem ser os peptídeos. (KREMSMAYR *et al.*, 2022).

Figura 1 - Processo de formação, organização e estrutura de colágeno



Fonte: Silva e Penna (2012)

De acordo com Nelson e Cox (2004), bem como Damodaran *et al.* (2010), as moléculas de tripla hélice apresentam domínios globulares terminais, e são denominadas de procolágeno, como pode ser observado na Figura 1. Estas regiões globulares são clivadas em graus variados para dar origem a estrutura ao tropocolágeno, que é unidade básica do colágeno. As moléculas de tropocolágeno são estabilizadas por ligações covalentes cruzadas em interações hidrofóbicas e eletrostáticas.

Existem diferentes tipos de colágenos nos vertebrados, em geral eles contêm cerca de 35% de glicina (Gly), 11% de alanina (Ala) e 21% de prolina (Pro) e hidroxiprolina (Hyp). A sequência de aminoácidos no colágeno é geralmente uma unidade tripeptídica repetitiva, Gly-X-Y, sendo frequentemente X a Pro e Y a Hyp (NELSON; COX, 2004). Foram relatados pelo menos 29 tipos diferentes de colágeno, que são classificados de acordo com sua estrutura em: estriado (fibroso), não fibroso (formador de rede), microfibrilar (filamentoso) e associado às fibrilas (DAMODARAN *et al.*, 2010).

O colágeno do Tipo I é o mais abundante, principalmente nos tecidos conectivos, tais como pele, tendões e ossos. É composto de três cadeias polipeptídicas, das quais duas são idênticas, denominadas cadeia $\alpha 1$ (I) e uma $\alpha 2$ (I) com a composição de aminoácidos diferente. Este tipo de colágeno está entre as estruturas proteicas transportadoras de estresse mais importantes em mamíferos. Para que a fibrila desempenhe essa função, ocorrem dobras na região de gap das fibrilas durante o empacotamento devido aos baixos níveis de prolina e hidroxiprolina, resultando em uma densidade de empacotamento reduzida em comparação com a região de sobreposição (PATINO, *et al.*, 2002).

O colágeno do Tipo II ocorre praticamente exclusivamente em tecido de cartilagem e acredita-se que a subunidade $\alpha 1$ (II) seja semelhante à $\alpha 1$ (I) (SCHRIEBER; GAREIS, 2007). Contém três cadeias α idênticas que possuem características cromatográficas e eletroforéticas semelhantes às cadeias α -1 do colágeno tipo I. Estas cadeias são designadas α -1(II). O colágeno da cartilagem tem um conteúdo relativamente alto de hidroxilisina e hidroxilisina glicosilada e é sintetizado durante os estágios condrogênicos do desenvolvimento do mesoderma. O colágeno do tipo II tem outro processo que aquele do tipo I, porque suas moléculas não são quebradas e sua formação é feita em baixas temperatura (PATINO, *et al.*, 2002).

O colágeno tipo III é composto por três cadeias α -1(III) idênticas. Este colágeno tem um alto teor de hidroxiprolina e é baixo em hidroxilisina (PATINO, *et al.*, 2002). Este tipo de colágeno, é fortemente dependente da idade, pois uma pele muito jovem pode conter até 50%, mas, com decorrer do tempo, pode ser reduzido para 5 a 10%. Os outros tipos de colágeno estão presentes apenas em quantidades muito reduzidas, principalmente em órgãos específicos, como

lâminas basais, córnea, músculo do coração, pulmão e mucosa intestinal (SCHRIEBER; GAREIS, 2007; KARIM; BHAT, 2009).

3.3 Hidrolisados proteicos

Hidrolisados de proteínas são concentrados proteicos, obtidos através da hidrólise enzimática de proteínas nativas em peptídeos menores, que geralmente contém de 2 a 20 aminoácidos (CHALAMAIAH *et al.*, 2012). A hidrólise proteica pode ser realizada por hidrólise enzimática ou hidrólise química, temperatura, com ácidos ou álcalis, no entanto a hidrólise enzimática é mais indicada para a produção de hidrolisados com aplicações nutricionais. O uso de enzimas ao invés de reagentes químicos é benéfico, uma vez que permite o controle da hidrólise melhorando as propriedades do produto final (SHMIDT; SALAS-MELLADO, 2009).

Várias proteases comerciais têm sido usadas para a produção de hidrolisados de proteínas e peptídeos, dentre elas a tripsina, pepsina, Flavourzyme®, Alcalase®, protease P., pronase, colagenase, bromelaína e papaína (BHASKAR *et al.*, 2007; YANG *et al.*, 2008; SCHMIDT; SALAS-MELLADO, 2009; CHI *et al.*, 2015; FU *et al.*, 2018). A especificidade da enzima afeta o tamanho, a quantidade e a composição dos aminoácidos livres e dos peptídeos, que influenciam a atividade biológica dos hidrolisados (GOMÉZ-GUILLÉN *et al.*, 2011).

A hidrólise enzimática de proteínas altera o seu tamanho molecular gerando uma mistura de aminoácidos livres, di-, tri- e oligo-peptídeos, aumenta o número de grupos polares, a solubilidade, altera a estrutura e altera a força de interação intra e intermolecular (SANTOS *et al.*, 2011; BAO *et al.*, 2017). Como as propriedades funcionais das proteínas estão relacionadas à sua estrutura (sequência e composição de aminoácidos, peso molecular, conformação e carga distribuída na molécula) a funcionalidade é alterada pelo processo de hidrólise, melhorando a qualidade funcional e disponibilidade (SANTOS *et al.*, 2011). Assim, a hidrólise proteica deve ser cuidadosamente monitorada e controlada para fins de fabricação de produtos com a funcionalidade desejada (BAO *et al.*, 2017).

Na Tabela 1 podem ser observados dados quanto condições de hidrólise a partir da literatura consultada.

Tabela 1- Dados gerais levantados quanto condições de hidrólise a partir da literatura (E:S, proporção entre enzima e substrato)

Fonte	Enzimas utilizadas	Condições de hidrólise				Bioatividade/ Funcionalidade	Referências			
		Enzima (E:S, %)	T (°C)	pH	Tempo (min)					
Gelatina de peixe	Alcalase®	6	50	7.5	120	Antioxidante e Conversor de AChE	Huang <i>et al.</i> (2018)			
	Flavourzyme®	6	50	7.5	120					
	Alcalase+	6 Alc. + 6	50	7.5	120					
	Flavourzyme®	Flav.								
Pele de peixe	Alcalase®	1	58	8.5	90	Antioxidante e Anticâncer	Yaghoubzadeh <i>et al.</i> (2020)			
	Flavourzyme®	1	50	7	90					
Farinha de ossos de peixe	Alcalase®	10	60	8	0, 20, 40,	Conversor de AChE	Borges- Contreras <i>et al.</i> (2019)			
	Flavourzyme®	10	50	7	60, 80 e 100					
Proteína isolada de peixe	Alcalase®	0.08-5.54	50	8	60	Antioxidante	Yarnpakdee <i>et al.</i> (2014)			
	Flavourzyme®	0.07-11.69	50	7	60					
	Protamex®	0.58-8.67	40	6	60					
	Papaina	0.83-4.69	40	7	60					
	Alcalase®+	Alc.: 0.08-	50	8	60					
	Flavourzyme® (duas etapas)	5.54 Flav.: 5.54	50	7	60					
	Alcalase®+	Alc.: 0.08-	50	8	60					
	Protamex® (duas etapas)	5.54 Prot.: 5.54	40	6	60					
	Alcalase®+	Alc.: 0.08-	50	8	60					
	Papaina (duas etapas)	5.54 Pap.: 5.54	40	7	60					
	Carne de frango	Pepsina	1.8-2.2	33-37	2.8- 3.2			240-360	Estabilidade oxidativa	Chai <i>et al.</i> (2020)
Farinha de penas de frango		Alcalase®	2.5 e 5	50	8	240	Antioxidante	Jeampakdee <i>et al.</i> (2020)		
		Flavourzyme®	2.5 e 5	50	7	240				
	Neutraxe®	2.5 e 5	50	7	240					
Anchova	Lisina	0.15	55	6.8	120	Antioxidante e Conversor de AChE	Zhao <i>et al.</i> (2016)			
		0.1	55	6.8	240					
		0.25	55	6.8	480					
Soja	Alcalase®	2	60	4	180	Antioxidante	Horax <i>et al.</i> (2016)			
Cartilagem esternal de frango	Alcalase®	0,5	55	7	540	Neutralizador de osteoporose	Lin <i>et al.</i> (2018)			
Arroz	Alcalase®	1	55	8	360	Antioxidante	Pantao <i>et al.</i> (2020)			
	Flavourzyme®	1	50	7	360					
	Neutraxe®	1	50	7	360					
Cristas e barbilhas de Frango	Alcalase®	5	60	8	240	Antioxidante	Bezerra <i>et al.</i> (2020)			
Resíduos de CMS de frango	Flavourzyme®	4	75	7	120	Propriedades funcionais colágeno	Schmidt <i>et al.</i> (2020)			
	Alcalase®	4	55	7.5	120					
Carne de peru	Flavourzyme®	3	50.1	5.4	66	Antioxidante	Wang e Shahidi (2018)			
Plasma de pato	Alcalase®	0.3	65.5	10	360	Antioxidante	Yang <i>et al.</i> (2020)			
Esguicho do mar	Pepsina	1	37	2	120	Antioxidante	Kim <i>et al.</i> (2018)			
CMS de frango	Alcalase®	0.1	50	-	60	Anti-inflamatório <i>in vivo</i>	Aloysius <i>et al.</i> (2018)			
	Protamex®	0.1	50	-	60					
	Corolase	0.1	50	-	60					
	Papaina + Bromelaina	0.05:0.05	50	-	60					
Vieira	Pepsina	1	37	2	300	Antioxidante, emulsificante e peroxidação lipídica	Wang <i>et al.</i> (2021)			
	Dispase	1	50	7	300					
	Alcalase®	1	50	8	300					

Fonte: dados obtidos pela pesquisadora (2023) a partir da literatura consultada

Zhou *et al.* (2016) extraíram colágeno a partir de pés de frango em diferentes frações, numa sequência de extrações: 1) extração com solução salina (0,45 M NaCl em 0,05 M Tris-HCl, pH 7,5); 2) extração com solução ácida (ácido acético a 0,5 M); 3) extração com pepsina (0,1 % p/v em solução 0,5 M ácido acético, pH 2).

Os autores encontraram os seguintes rendimentos para cada etapa: 1,13; 14,49 e 49,10% respectivamente. Todos os colágenos apresentaram estrutura helicoidal tripla intacta (Dicroísmo Circular) e topografia de superfície similar (Microscopia de Força Atômica). O colágeno solúvel em pepsina mostrou maior estabilidade térmica e maior grau de hidrólise em relação aos demais (ZHOU *et al.*, 2016).

A influência da concentração de substrato (3,3 a 11,7%), concentração de enzima Alcalase® e Flavourzyme® (2,9 a 9,1%) e o tempo de hidrólise (39,6 a 140,4 minutos) no grau de hidrólise nas proteínas de peito e de coxa de frango foram testadas por Shmidt e Sallas-Mellado (2009). Os valores de grau de hidrólise obtidos com a enzima Alcalase® foram superiores aos da enzima Flavourzyme®. Foi observado um efeito negativo da concentração de substrato e um efeito positivo da concentração de enzima e do tempo no grau de hidrólise das proteínas.

A obtenção de peptídeos biologicamente ativos é outra forma de uso para o colágeno e a gelatina das mais diversas fontes, devido à sua atividade antimicrobiana, antioxidante e anti-hipertensiva (KIM *et al.*, 2011; LI *et al.*, 2007; BERNARDINI *et al.*, 2012; LIN *et al.*, 2012), sendo usado em formulações nutricionais de farmacêuticas (GOMÉZ-GUILLÉN *et al.*, 2011). A gelatina e o colágeno são formas diferentes da mesma macromolécula, de modo que a gelificação da gelatina pode ser descrita como uma reforma parcial da estrutura do colágeno (LEDWARD, 1986).

3.4 Inibição Acetilcolinesterase e Alzheimer

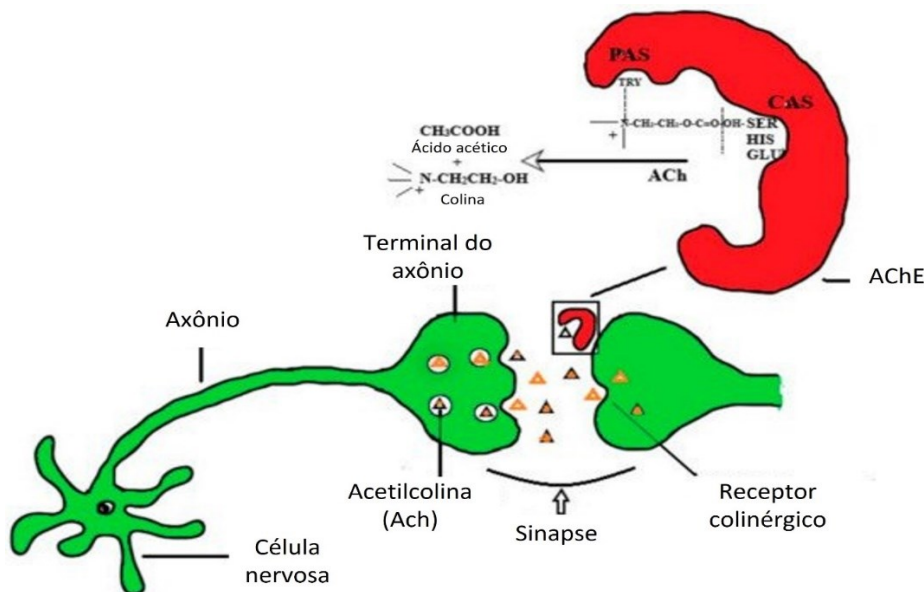
A doença de Alzheimer (DA) é uma doença da vida adulta, afetando uma em cada quatro pessoas com 85 anos ou mais, e a incidência deverá aumentar nos próximos anos, com 131,5 milhões de casos estimados até 2050 (MOSS, 2020). A DA tem sido tradicionalmente definida com base em três alterações neuropatológicas clássicas no cérebro de pacientes com DA.

A DA foi caracterizada pela primeira vez na primeira década do século passado pelo acúmulo de β -amilóide extracelular agregado (placa senil) e agregação intracelular de tau hiperfosforilada (emaranhados neurofibrilares). Um terceiro marcador fisiopatológico da DA é

uma grave perda de neurônios no sistema colinérgico do mesencéfalo que fornece as principais projeções colinérgicas para o córtex e o hipocampo (MOSS, 2020).

Supõe-se que a acetilcolinesterase (AChE) lisa a acetilcolina (ACh) a uma taxa muito rápida até 10.000 moléculas por segundo. A enzima possui principalmente dois sítios ativos, sítio aniônico periférico (PAS) e sítio ativo catalítico (CAS), para a ligação do substrato, ou seja, acetilcolina. A ACh sequestra temporariamente para o PAS através da interação π -cation entre o triptofano na superfície da enzima e a amina quaternária da ACh. Mais tarde, um intermediário tetraédrico se forma no CAS (no desfiladeiro mais profundo da enzima) por uma reação entre o átomo de oxigênio do grupo acetil da ACh e o resíduo serina-histidina-glutamato da enzima através de uma ligação covalente (MOSS, 2020). A acetilcolinesterase tem papel na transmissão nervosa, podendo se observa o exposto na Figura 2.

Figura 2 - Transmissão da acetilcolina (ACh) por sinapse (transmissão colinérgica) e ação da acetilcolinesterase (AChE) sobre a acetilcolina



*ACh: acetilcolina; AChE: acetilcolinesterase; PAS: sítio aniônico periférico; CAS: sítio ativo catalítico; TENTE: triptofano; SER: serina; HIS: histidina; GLU: glutamato.

Fonte: adaptado de Moss (2020)

Atualmente, a terapia aprovada pela FDA para o tratamento sintomático da DA leve a moderada inclui três inibidores da colinesterase (IChEs) donepezil, galantamina e rivastigmina, e um antagonista do receptor de glutamato, a memantina. A FDA também aprovou a memantina, o adesivo transdérmico de rivastigmina e o donepezil para o tratamento da DA grave (AHMED *et al.*, 2021).

Os pacientes são iniciados com IChEs para alívio sintomático, mas o tratamento geralmente continua até os estágios avançados da doença. A maioria das drogas que são usadas atualmente para o tratamento da DA são inibidores da AChE, que incluem: galantamina (1), donezepil (2), tacrina (3), rivastigmina (4) dos quais a galantamina é um alcalóide natural (AHMED *et al.*, 2021).

Obtidos pela primeira vez de *Galanthus* spp. o donezepil e a tacrina foram feitos sinteticamente e são aprovados pelo US-FDA. A rivastigmina foi concebida a partir de um alcalóide natural, a fisostigmina. Outro alcalóide natural, Huperzine A (5), é o IChE e é usado em suplementos alimentares para suporte de memória (AHMED *et al.*, 2021).

Múltiplos compostos com atividade anticolinesterase têm sido derivados de fontes naturais à base de plantas, além de e hidrolisados proteicos (MOREIRA *et al.*, 2022). Embora muito poucos relatos tenham demonstrado a captação de peptídeos no cérebro, a presença de transportadores de peptídeos ativos (PT1-PT5) na barreira hematoencefálica indica um mecanismo fisiológico através do qual proteínas e peptídeos podem ser transferidos da circulação sanguínea para o cérebro (ALUKO, 2021).

Peptídeos obtidos de hidrolisados de proteínas, principalmente aqueles adquiridos de hidrolisado de colágeno, têm recebido atenção especial dos pesquisadores devido às suas bioatividades inerentes. A literatura tem relatado propriedades quelantes minerais, antioxidantes, anti-hipertensivas, antitrombóticas, antiulcerativas, cicatrizantes e osteoprotetoras, bem como propriedades que melhoram a absorção/biodisponibilidade de minerais (BEZERRA *et al.*, 2020). Ainda, o hidrolisado de Tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) (MOREIRA *et al.*, 2022), de pescada olhuda (*Cynoscion guatucupa*) (LIMA *et al.*, 2023) e de pele de suíno (KIM *et al.*, 2019) já foram reportados à frente de acetilcolinesterase, mas ainda há falta de informação na literatura sobre o uso de hidrolisados de cartilagem de frango para este fim.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Pré-tratamento da CEF

A cartilagem esternal de frango (CEF), doada por um abatedouro de aves da região de Campo Mourão, PR), foi moída em moedor elétrico de carne, homogeneizada (pool) e congelada. Após este período, foi armazenada em freezer e depois utilizada para a produção de hidrolisado proteico.

4.2 Análise de composição centesimal

A umidade da cartilagem esternal de frango moída foi determinada de acordo com o método gravimétrico, a 105 °C até peso constante. Na análise de cinzas, os resíduos foram incinerados em uma mufla à temperatura de 550 °C. Para a obtenção do teor de proteínas foi utilizado o método de Microkjeldahl e o de lipídios determinado pelo método de Bligh-Dyer (LUTZ, 2008).

4.3 Obtenção do hidrolisado proteico

A obtenção do hidrolisado proteico foi realizada conforme metodologia descrita em (ALVARES *et al.*, 2018), com algumas adaptações (HALIM; YUSOF; SARBON, 2016). Para isso, a CEF foi descongelada durante a noite à temperatura ambiente. Foram obtidos dois hidrolisados proteicos diferentes (A e F) ao realizar a hidrólise enzimática utilizando duas enzimas: Alcalase® 2,4 L (Sigma-Aldrich) e Flavourzyme® (Sigma-Aldrich), na qual os parâmetros da hidrólise foram ajustados conforme os requisitos de cada enzima baseado na literatura consultada.

Primeiramente, as amostras foram solubilizadas em água destilada (1:5, p:v). Em seguida, cada amostra teve seu pH ajustado para 8 e 7 utilizando NaOH 1 M ou HCl 1 M, para a hidrólise realizada por Alcalase® e Flavourzyme® respectivamente. Por fim, foram adicionados 1,8 % de cada enzima com relação ao teor de proteínas presentes na amostra (E:S). Este processo de hidrólise foi realizado sob agitação em banho-maria com temperatura ajustada a 50°C para as amostras hidrolisadas com Alcalase® e Flavourzyme®.

Após o tempo de 4 h de hidrólise, as enzimas foram inativadas por aquecimento a 90 °C por 15 min em banho-maria. A mistura foi então centrifugada a 6.000 rpm por 10 min e o

sobrenadante coletado e filtrado em filtro de celulose (80 g/m²) com auxílio de uma bomba à vácuo. Os hidrolisados obtidos foram congelados em freezer por 24 h e secos em liofilizador.

4.4 Determinação do grau de hidrólise do sobrenadante (GH)

Para a determinação do Grau de Hidrólise do Sobrenadante (GH), foi adaptada a metodologia descrita em Nepomuceno (2018), na qual, logo após a hidrólise foram retiradas alíquotas de 6 mL que foram precipitadas com 4 mL de ácido tricloroacético (TCA) 6,25%, seguido de repouso por 15 min e, por fim, centrifugadas a 6.000 rpm por 10 minutos. Então, foi determinada a concentração de proteínas solúveis existentes nos hidrolisados (fração solúvel do sobrenadante, com menor tamanho de cadeia molecular) pelo método de Lowry modificado (LOWRY *et al.*, 1951).

Para isto, foi utilizada uma curva padrão de Albumina Bovina Sérica (A7030, Sigma-Aldrich) ($y = 16,541x + 0,0238$; $R^2 = 0,9915$) para comparação das leituras de absorbâncias em 750 nm que foram realizadas em espectrofotômetro UV-Vis. Assim, o Grau de Hidrólise (GH) foi calculado através da Equação 1, na qual a concentração de proteínas totais foi determinada previamente a partir dos resíduos sólidos, como descrito no item de composição centesimal.

$$GH(\%) = \frac{\text{Proteína Solúvel em 6,25\% de TCA (mg)}}{\text{Proteína Total (mg)}} \times 100\% \quad (\text{Equação 1})$$

4.5 Rendimento

Após a inativação térmica da hidrólise enzimática a amostra foi resfriada à temperatura ambiente, pesada e em seguida fracionada em centrífuga nas condições de 6.000 rpm durante 10 minutos, na qual, a fração aquosa (contendo o hidrolisado proteico) foi transferida, pesada e armazenada em freezer. O rendimento foi calculado conforme a Equação 2.

$$\text{Rendimento}(\%) = \frac{\text{Massa da fração aquosa (g)}}{\text{Massa do hidrolisado sem fracionar (g)}} \times 100\% \quad (\text{Equação 2})$$

4.6 Atividade antioxidante do hidrolisado

A determinação da capacidade antioxidante foi realizada utilizando diferentes métodos:

DPPH como radical livre: seguindo a metodologia descrita por Brand-Williams, Cuvelier e Berset (1995), com algumas alterações. Foram adicionados 50 µL de extrato em 1.950 µL de solução metanólica de DPPH 60 µmol/L em um tubo de ensaio, e 50 µL de etanol em 1.950 µL de DPPH em um outro tubo (controle negativo), sendo o experimento realizado em triplicata. As soluções ficaram ao abrigo da luz por 30 minutos e então, realizou-se a leitura da absorbância em espectrofotômetro a 517 nm, usando metanol como branco. Os resultados finais foram obtidos por meio da curva de calibração de trolox ($y = 0,0905 x + 0,8656$) e expressos em µmol de equivalente de trolox por 100 gramas de hidrolisado.

Método de ABTS: foi avaliada seguindo o método descrito no trabalho de Thaipong *et al.* (2006). A solução de trabalho foi preparada pela mistura de duas soluções em quantidades iguais (20 mL cada), uma solução de 7,4 µmol/L de ABTS com 2,6 µmol/L de persulfato de potássio que reagiram durante 12 horas no escuro. Depois desse período, 1 mL dessa mistura foi adicionado à 60 mL de metanol (chamada solução de trabalho), em seguida realizou-se a leitura de absorção para verificar se o valor está próximo de $1,10 \pm 0,02$ em espectrofotômetro Uv-Vis a 734 nm.

Para análise propriamente dita, portanto, foram misturados 150 µL de solução de hidrolisado (concentrações a definir) com 2.850 µL da solução de trabalho em tubos de ensaio, ficando armazenados ao abrigo da luz durante duas horas. Então realizou-se as leituras das absorbâncias das amostras a 734 nm. Os valores obtidos foram comparados com a curva de calibração de trolox e expressos em µmol de equivalente de trolox por 100 gramas de hidrolisado de CEF.

FRAP: a determinação da capacidade antioxidante por FRAP foi feita de acordo com o método descrito no trabalho de Thaipong *et al.* (2006) As soluções de estoque foram de tampão de acetato 300 mM (3,1 g $C_2H_3NaO_2 \cdot 3H_2O$ e 16 mL $C_2H_4O_2$), pH 3,6, solução TPTZ 10 mM (2, 4, 6-tripiridil-s-triazina) em HCl 40 mM e solução 20 mM de $FeCl_3 \cdot 6H_2O$. A solução de trabalho fresca foi preparada misturando 25 mL de tampão de acetato, 2,5 mL de solução de TPTZ e 2,5 mL de solução de $FeCl_3 \cdot 6H_2O$ e, em seguida, aqueceu-se a 37 °C antes de usar. Soluções de extrato (150 mL) reagiram com 2.850 mL da solução FRAP por 30 min no escuro. As leituras do produto colorido [complexo ferroso de tripiridiltriiazina] foram feitas a 593 nm. A curva padrão foi utilizada com Trolox. Os resultados foram expressos em mM TE / g amostra.

TBARS: Cérebros de rato, obtidos na Universidade Estadual de Maringá (projeto aprovado no comitê de ética com o protocolo (CEUA N° 2935011018)), foram dissecados e homogeneizados com um Ultraturrax em tampão Tris-HCl gelado (20 mM, pH 7,4), para produzir um homogenato de tecido cerebral 1:2 (p/v) que foi centrifugado a 3.000 g durante 10

min. Uma alíquota (0,1 mL) do sobrenadante foi incubada com as diferentes concentrações da solução de hidrolisado de CEF (0,2 mL) na presença de FeSO₄ (10 mM; 0,1 mL) e ácido ascórbico (0,1 mM; 0,1 mL) a 37 °C durante 1 h. A reação foi interrompida pela adição de ácido tricloroacético (28% p/v, 0,5 mL), seguido por ácido tiobarbitúrico (TBA, 2%, p/v, 0,38 mL), e a mistura então foi aquecida a 80 °C durante 20 minutos. Após, foi centrifugado novamente a 3000 g durante 10 min, para remover a proteína precipitada e a intensidade da cor do complexo MDA-TBA (complexo cromóforo de malodialdeído- ácido tiobarbitúrico) no sobrenadante foi medida pela sua absorvância a 532 nm em UV-Vis. A taxa de inibição (%) foi calculada usando a Equação (3).

$$\text{Taxa de inibição (\%)} = \frac{(A-B)}{A \times 100} \quad \text{Equação (3)}$$

Onde:

A é a absorvância do controle

B é a absorvância da solução contendo hidrolisado de CEF.

4.7 Inibição da atividade de AChE

A atividade da AChE foi avaliada conforme descrito por Ellman *et al.* (1961). Para isto, primeiramente foi realizado o preparo da solução Tris-HCl (0,05 M, pH 7,5) contendo a AChE de *Electrophorus electricus* a 1,25 U/mL (Sigma, C3389 500 UN).

O meio de reação foi composto por 100 µL de tampão fosfato de potássio (TFK, 100 mM, pH 7,5), 20 µL de água, 10 µL da solução contendo a enzima AChE e 20 µL de solução de hidrolisado proteico (diferentes concentrações que foram definidas por ensaios preliminares: 20, 30 e 40 mg.mL⁻¹), além da formulação sem adição de hidrolisado proteico (branco).

Primeiramente, o meio foi incubado a 25 °C por 10 minutos e em seguida, adicionados 20 µL de 5,5'-Ditiobis (ácido 2-nitrobenzóico) (DTNB) e 20 µL de solução contendo o substrato acetil tiocolina (ASCh, 8 mM em água Milli-Q). A leitura da absorvância foi realizada a cada minuto durante 4 minutos em comprimento de onda de 405 nm por meio de leitor de placas (Thermo-Plate Reader). Os resultados foram expressos em porcentagem de atividade em relação ao controle (100 %).

4.8 Determinação do perfil de aminoácidos dos hidrolisados

O método para análise de aminoácidos foi realizado baseado em White *et al.* (1986), Hagen *et al.* (1989). As amostras foram submetidas a hidrólise ácida e derivatização pré-coluna com isotiocianato de fenil (PITC). A separação de aminoácidos foi realizada por cromatografia líquida de fase reversa (SHIMADZU Corporation, Tóquio, Japão) equipada com coluna de fase reversa C18 (50 °C) (LUNA C18, 100 Å, 5 µm, 250 × 4,6 mm, Phenomenex Inc., Torrance, EUA), com detector DAD em 254 nm. A fase móvel usada foi um gradiente composto por (A) tampão de acetato de sódio 94% (0,036 M, pH 6,4) + 5,7% acetonitrila e (B) acetonitrila 40%. Tempo de gradiente (45 min): na concentração da fase móvel A e tempo (min), respectivamente (95%, 0-5), (77,5%, 5-10), (68%, 10-12), (40 %, 12–20), (0%, 20–36), (95%, 36–45) e taxa de fluxo de 1 mL.min⁻¹, volume injetado: 50 µL.

4.9 Análises estatísticas

Todos os resultados foram analisados pelo teste t-Student ou ANOVA seguida pelo teste de Tukey no software Matlab (R2022b, Mathworks) com nível de significância de 5%.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Composição centesimal

Na pesquisa o primeiro aspecto observado foi referente a composição centesimal da cartilagem de frango, sendo os resultados expostos na Tabela 2.

Tabela 2 - Composição centesimal da cartilagem esternal de frango

Amostra	Composição centesimal (% _{base úmida})			
	Umidade	Cinzas	Proteína	Lipídios
Cartilagem	18,28 ± 0,31	2,17 ± 0,12	48,18 ± 1,50	0,72 ± 0,18

Fonte: dados obtidos pela pesquisadora (2022)

Pode-se observar na Tabela 2 tem-se que a cartilagem apresentou 18,28 ± 0,31 % de umidade, 2,17 ± 0,12 % de cinzas, 48,18 ± 1,50 % de proteína e 0,72 ± 0,18 % de lípidios. Em estudo de Akram e Zhang (2020), que extraíram o colágeno da cartilagem esternal do frango utilizando ultrassom, viu-se que o teor de proteína encontrado nas amostras ficou na faixa de 70 a 85% em base seca.

Ainda no trabalho de Akram e Zhang (2020), o teor de gordura determinado foi entre 0,2 e 1% de peso seco. Os autores compararam a extração do colágeno com e sem tratamento por ultrassom. Os teores de cinzas e gordura foram menores no colágeno tratado por ultrassom. No presente trabalho o teor de cinzas determinado foi de 2,17 ± 0,12 %.

Em outro estudo de Akram e Zhang (2020), em que além de ultrassom a pepsina foi utilizada para extração do colágeno, os autores analisaram a composição centesimal da cartilagem antes de processada (crua) e após ser pré-tratada. A umidade da cartilagem crua foi de 74,32 ± 0,2% e na pré-tratada foi de 81,76 ± 0,42%, valores muito superiores ao encontrado no estudo realizado no presente trabalho cujo método significou 18,28 ± 0,31 % de umidade.

Os demais resultados nesse estudo de Akram e Zhang (2020), também foram diferentes em cinzas e proteína. Cinzas na cartilagem pré-tratada foram de 0,43 ± 0,7%, proteínas foram de 13,53% ± 0,35. Em estudo de Cao *et al.* (2013), com uso de método com solubilizando com pepsina o colágeno da cartilagem esternal, as cinzas tiveram referência de composição aproximada de 6,97 %.

No estudo de Shen *et al.* (2019), viu-se componentes de gordura menores, com 0,26 ± 0,04 % e as cinzas foram de 6,29 ± 0,43 % na cartilagem seca, mas os principais elementos

observados vieram a ser a proteína com $73,35 \pm 0,36$ % e carboidratos com $20,10 \pm 0,71$ %. Os resultados permitiram considerar que a cartilagem esternal pode ser usada para isolamento de sulfato de condroitina e os peptídeos. Nos resultados verificados em Dhakal *et al.* (2018), os teores de gordura foram de 4,44% e de cinzas vieram a ser de 14,28% na matéria seca.

5.2 Rendimento e GH

Os resultados quanto ao rendimento e grau de hidrólise (GH) dos hidrolisados de cartilagem de frango conseguidos por intermédio de hidrólise enzimática com enzima Alcalase® e Flavourzyme® estão apresentados na Tabela 3.

Tabela 3- Rendimento e Grau de Hidrólise (GH) dos hidrolisados de cartilagem de frango obtidos por hidrólise enzimática com enzima Alcalase® e Flavourzyme®

Enzima aplicada na hidrólise	Rendimento (%)	GH (%)
Alcalase®	$97,42^a \pm 3,05$	$19,86^a \pm 1,21$
Flavourzyme®	$93,71^a \pm 3,64$	$8,98^b \pm 0,25$

^{a,b}Letras diferentes na mesma coluna indicam diferença estatisticamente significativa pelo teste t-Student ($p < 0,05$)

Fonte: dados obtidos pela pesquisadora (2022)

O rendimento dos hidrolisados de cartilagem de frango obtidos por hidrólise enzimática com enzima Alcalase® foram de 97,42%, enquanto que com a enzima Flavourzyme® esse foi de 93,71%. No que se refere ao Grau de Hidrólise (GH) dos hidrolisados de cartilagem de frango obtidos por hidrólise enzimática com enzima Alcalase® foram de 19,86% e mediante a Flavourzyme® os resultados foram de 8,98%.

Sobre o exposto tem-se estudo de Bezerra *et al.* (2020), utilizando cartilagem de frango (cristas e barbelas do frango), onde esse teve resultados semelhantes no desempenho da enzima Alcalase® no rendimento e grau de hidrólise. Os autores realizaram um planejamento experimental para determinar o ponto ótimo (240 min de hidrólise e 5% p/p razão enzima/substrato) para a hidrólise de proteínas e determinaram um GH de $18,6\% \pm 0,37$. O valor determinado pelos autores foi próximo ao determinado no presente trabalho, onde o GH dos hidrolisados de cartilagem de frango obtidos por hidrólise enzimática em enzima Alcalase® foi de $19,86\% \pm 1,21$.

Nos resultados de Schmidt *et al.* (2020), com pesquisa em substrato de resíduo carne de frango mecanicamente separada, ao se obter hidrolisados de colágeno com uso das enzimas Alcalase® e Flavourzyme®, foi possível observar as propriedades funcionais de ambas, onde o maior grau de hidrólise foi obtido com a enzima Alcalase®, 36,11 %, enquanto com a enzima

Flavourzyme® esse foi de 12,02 %. No presente estudo, os resultados foram menores para as duas enzimas quando comparados aos resultados de Schmidt *et al.* (2020). Ainda, assim como no presente estudo, Schmidt *et al.* (2020), obteve resultados superiores com a Alcalase® e destacou que com esta enzima houve não só maior clivagem de ligações, como trouxe peptídeos de menor peso molecular válidos para uso industrial e com benefícios aproveitáveis para a saúde.

Observa-se também na pesquisa de Pramualkijja, Pirak e Euston (2021), informações importantes em pesquisa com cartilagem de frango (traqueia) e hidrólise enzimática. Os autores avaliaram o uso de diferentes enzimas, (Alcalase®, Flavourzyme®, papaína e Protamex®), tendo a Alcalase® os melhores resultados em grau de hidrólise, seguido da papaína, Protamex® e por último a Flavourzyme®.

Entende-se, que o rendimento dos hidrolisados de cartilagem de frango obtidos por hidrólise enzimática com enzima Alcalase® de 97,42% e o GH dos hidrolisados no total de 19,86% advém de maior atividade enzimática da Alcalase®. Geralmente, as proteases alcalinas, como a Alcalase®, demonstram atividades e graus de hidrólise mais altos que as proteases neutras e ácidas (DINIZ; MARTIN, 1996). A Alcalase® é endopeptidase, tem alta especificidade para resíduos aromáticos (Phe, Trp e Tyr), ácidos (Glu), contendo enxofre (Met), alifáticos (Leu e Ala), hidroxila (Ser) e básicos (Lys) (DOUCET *et al.*, 2003). Capaz de hidrolisar proteínas com ampla especificidade de ligações peptídicas. Já a Flavourzyme® é a mistura de enzimas endo e exopeptidase, que pode produzir aminoácidos e peptídeos (KLOMPONG, *et al.*, 2008).

5.3 Capacidade antioxidante

Diferentes estudos têm como foco na ação antioxidante dos hidrolisados proteicos, sendo a cartilagem de frango um dos substratos para tal. Os resultados determinados quanto a capacidade antioxidante dos hidrolisados podem ser observados na Tabela 4.

Tabela 4 - Capacidade antioxidante: concentração equivalente em trolox por grama de amostra (DPPH, FRAP e ABTS) e porcentagem de inibição da peroxidação lipídica (cérebro de rato, TBARS) de soluções contendo 30 mg/mL de hidrolisado de cartilagem esternal de frango obtidos com Alcalase® e Flavourzyme®

Enzima aplicada na hidrólise	Atividade antioxidante			
	$\mu\text{mol}_{\text{ET}}/\text{g}_{\text{amostra}}^*$ ($\mu\text{mol}_{\text{ET}}/\text{mL}$)			% inibição
	DPPH	FRAP	ABTS	TBARS
Alcalase®	55,78 ^a ± 2,01 *(1,67 ± 0,06)	12,20 ^a ± 0,42 *(0,366 ± 0,01)	30,91 ^a ± 0,06 *(0,927 ± 0,00)	55,89 ^b ± 2,25
Flavourzyme®	53,18 ^a ± 3,33 *(1,59 ± 0,09)	11,24 ^a ± 0,31 *(0,337 ± 0,01)	31,18 ^a ± 0,06 *(0,935 ± 0,00)	74,20 ^a ± 0,71

^{a,b}Letras diferentes na mesma coluna indicam diferença estatisticamente significativa pelo teste t-Student ($p < 0,05$)

Fonte: dados obtidos pela pesquisadora (2022)

Os resultados apresentados na Tabela 4 indicam que apesar de ter havido diferença significativa no GH (Tabela 3), a enzima utilizada para a hidrólise não afetou a capacidade antioxidante dos hidrolisados com relação aos métodos de DPPH, FRAP e ABTS. Já com relação ao método de TBARS, para a mesma concentração de hidrolisado (30 mg/mL) a capacidade de inibição da peroxidação lipídica foi estatisticamente maior para o hidrolisado obtido com Flavourzyme®. Klopong *et al.* (2008) encontraram resultados significativamente diferentes para hidrolisados de músculo de *Selaroides leptolepis* obtidos com Alcalase® e Flavourzyme®. Os autores descrevem que provavelmente a clivagem das ligações peptídicas ocorreu em diferentes posições, levando a diferentes produtos com atividade antioxidante variável.

Os hidrolisados de traqueia de frango (Alcalase®) produzidos por Pramualkijja, Pirak e Euston (2021) apresentaram as seguintes capacidades antioxidantes em ordem de eficiência de inibição de oxidação: ABTS = 134,29–148,84 $\mu\text{mol}_{\text{TE}}/\text{mL}$ > FRAP = 16,67–22,48 $\mu\text{mol}_{\text{TE}}/\text{mL}$, > DPPH = 4,02–4,27 $\mu\text{mol}_{\text{TE}}/\text{mL}$. Comparando com os valores obtidos no presente trabalho, que estão descritos entre parênteses na Tabela 4 (mesma unidade utilizada pelos autores), pode-se perceber que a ordem de eficiência na inibição da oxidação se deu com DPPH > ABTS > FRAP. Ainda, nota-se que a concentração equivalente em trolox para o DPPH do presente estudo foi aproximadamente 13 vezes maior que a determinada por Pramualkijja, Pirak e Euston (2021). Contudo, com relação à inibição da oxidação do radical ABTS e neutralização do íon férrico (FRAP) os hidrolisados do presente estudo foram aproximadamente 5 e 2 vezes menos eficientes.

Lin *et al.* (2018), em estudo com cartilagem de frango hidrolisada com diferentes enzimas, verificaram pelos testes antioxidantes que a Alcalase® permitiu a obtenção de maior

fração de peptídeos de pequeno tamanho ($M_w < 1$ kDa) e valores de IC₅₀ (concentração de hidrolisado capaz de inibir 50% da oxidação do radical) para DPPH de $4,66 \pm 0,09$ mg/mL.

Em estudo de Horax *et al.* (2016) foi realizada a hidrólise de proteína de soja com Alcalase®, sendo possível determinar resultados de até 11% de inibição da oxidação do DPPH (10 mg_{hidrolisado}/mL). Pantoa *et al.* (2020) avaliaram a hidrólise de farelo de arroz com três diferentes enzimas (Alcalase®, Flavourzyme® e Neutrase®) e identificaram que as capacidades antioxidantes frente ao DPPH e FRAP dos hidrolisados com Alcalase® foram consideravelmente maiores do que a proteína nativa. Ambas as atividades aumentaram em função do tempo de hidrólise até 4 h e então mantendo-se constantes.

Com relação à inibição da peroxidação lipídica (TBARS) o tecido (cérebro de rato) que contém material lipídico é colocado em contato com o possível antioxidante (hidrolisados da cartilagem esternal de frango, no caso do presente trabalho) e um agente que induz a oxidação (no caso um íon metálico, Fe²⁺). Após o processo oxidativo, adiciona-se ácido tiobarbitúrico (TBA) que reage com os produtos da oxidação formando compostos de coloração vermelha/rosa, conhecidos como substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (*Thiobarbituric Acid-Reactive Substances*, TBARS). A extensão da prevenção da oxidação dos lipídeos pelo antioxidante é então determinada por espectrofotometria (GHANI *et al.*, 2017).

Os resultados da Tabela 4 indicaram uma inibição da oxidação lipídica no substrato (cérebro de rato) significativamente maior pelo hidrolisado obtido com Flavourzyme®. A avaliação de capacidade antioxidante por TBARS de hidrolisados proteicos já foi feita por outros autores, contudo em alimentos onde o hidrolisado foi aplicado, ou seja, o substrato lipídico era o próprio alimento. Podem ser citados salsichas de frango adicionadas de colágeno de pé de frango (ARAÚJO *et al.*, 2021), surimi adicionado de hidrolisado de subprodutos de carpa prateada (ZHANG *et al.*, 2022), salsichas adicionadas de hidrolisados de gelatina (HAM *et al.*, 2022), etc. (Peña-Ramos; Youling, 2003; CAVALHEIRO *et al.*, 2014, SEO; SEO; YANG, 2016; BERNARDI *et al.*, 2016; BORRAJO *et al.*, 2021).

Deve-se ressaltar também que são encontradas metodologias modificadas de TBARS onde óleos vegetais ou ácido linoleico são utilizados como lipídeo, como nos trabalhos de Araújo *et al.* (2021) (hidrólise de pele de frango por Alcalase®) e Hu *et al.* (2020) (hidrolisados de glúten de milho por Neutrase® e Alcalase®), ou um sistema tipo lipossoma é produzido com a incorporação do hidrolisado (Dryáková *et al.*, 2010). Assim, os diferentes testes utilizados para estimar a capacidade antioxidante tornam muito difícil a comparação de resultados experimentais.

É sabido que a capacidade antioxidante de hidrolisados proteicos é influenciada por suas propriedades estruturais, como composição de aminoácidos e tamanho do peptídeo ou peso molecular. Grandes quantidades de aminoácidos hidrofóbicos são relacionadas à elevadas propriedades de eliminação de radicais livres (NWACHUKWU; ALUKO, 2019). Desta forma, é interessante identificar o perfil de aminoácidos das amostras para correlacionar tais informações com seus efeitos antioxidantes.

5.4 Inibição da acetilcolinesterase

Os resultados referentes à inibição da acetilcolinesterase, que é atividade importante para manter a propagação do impulso nervoso pelo neurotransmissor acetil tiocolina, estão demonstrados na Tabela 5.

Tabela 5 - Inibição de acetilcolinesterase (AChE) pelos hidrolisados de cartilagem de frango obtidos por hidrólise enzimática com enzima Alcalase® e Flavourzyme®

Concentração de amostra (mg.mL ⁻¹)	% de inibição de AChE	
	Alcalase®	Flavourzyme®
20	37,05 ^{a,C} ± 2,32	28,20 ^{b,A} ± 3,51
30	45,57 ^{a,B} ± 3,02	29,72 ^{b,A} ± 2,85
40	60,65 ^{a,A} ± 3,19	32,47 ^{b,A} ± 2,94

^{a,b}Letras diferentes na mesma linha indicam diferença estatisticamente significativa pelo teste t-Student (p < 0,05); ^{A,B}Letras diferentes na mesma coluna indicam diferença estatisticamente significativa pelo teste de Tukey (p < 0,05)

Fonte: dados obtidos pela pesquisadora (2022)

Observa-se na Tabela 5 que os resultados foram mais prevalentes quanto a inibição da AChE com a Alcalase®, pois em 20 mg.mL⁻¹ a capacidade de inibição foi 1,3 vezes maior que do hidrolisado por Flavourzyme®. O mesmo ocorreu para as outras duas concentrações de hidrolisados testadas, sendo 1,55 e 1,87 vezes maior para 30 mg.mL⁻¹ e 40 mg.mL⁻¹ respectivamente. Além disso, nota-se que para o hidrolisado de Flavourzyme® não houve diferença estatisticamente significativa (p > 0,05) quando comparadas as diferentes concentrações de hidrolisado na inibição. Já para o hidrolisado por Alcalase®, houve um aumento estatisticamente significativo (p < 0,05) quando a concentração de hidrolisado foi aumentada.

A observação dos dados demonstra que os resultados foram superiores aos vistos em outros estudos de inibição da AChE por hidrolisados proteicos. No estudo de Idowu *et al.*

(2021), com hidrolisados proteicos do gergelim (pepsina e pancreatina) foi determinada a inibição em uma concentração de hidrolisado vinte vezes menor do que a testada nessa pesquisa, 1 mg/mL, alcançando valores de inibição de até 17%. No trabalho desenvolvido por Malomo e Aluko (2016) hidrolisados de semente de cânhamo foram produzidos com Alcalase®, pepsina e papaína. Os autores encontraram uma inibição de 50% da atividade da AChE com o uso de aproximadamente 11 µg/mL de hidrolisado. Já Moreira *et al.* (2022) que hidrolisaram ossos, carcaça e barbatanas de tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) com Alcalase®, determinaram inibição de até $37,64 \pm 1,08$ % quando 50 mg/mL de hidrolisado foi utilizado no ensaio.

Especificamente, hidrolisados provenientes de frango não foram ainda avaliados quanto a inibição da acetilcolinesterase. Alguns trabalhos são encontrados na literatura sobre o uso de um extrato hidrolisado de frango, Propeptigen®/Cmi-168, um suplemento nutricional comercialmente disponível (AVIAN SCIENCE INSTITUTE, 2022). Os trabalhos destacam efeitos benéficos ao sistema cognitivo. Chou *et al.* (2019) descrevem que indivíduos tratados com o suplemento superaram o grupo placebo em testes de memória lógica e tarefa de memória de trabalho espacial, além de confirmarem efeitos anti-inflamatórios com níveis progressivamente decrescentes de proteína C reativa de alta sensibilidade (hs-CRP). Os autores ainda destacam que na forma livre, os aminoácidos são capazes de atravessar a barreira hematoencefálica (BBB, *blood-brain barrier*). No trabalho de Sun *et al.* (2012) o hidrolisado de proteína de peito de frango (papaína) demonstrou ter atividade antioxidante *in vivo* em camundongos envelhecidos induzidos por D-galactose. Com a análise do tecido hepático foi possível observar que o hidrolisado pode desempenhar um papel na inibição do estresse oxidativo dos hepatócitos *in vivo*.

Mediante a avaliação de rendimento, capacidade antioxidante e ação inibitória de acetilcolinesterase de hidrolisados de cartilagem esternal de frango, a enzima com melhor desempenho foi a Alcalase®, que também teve melhores resultados referente ao grau de hidrólise.

5.5 Análise de perfil de aminoácidos

A hidrólise enzimática pode interferir nas propriedades bioativas dos hidrolisados de cartilagem esternal de frango. Os resultados relativos à análise do perfil de aminoácidos dos hidrolisados produzidos com Flavourzyme® e Alcalase® estão apresentados na Tabela 6.

Tabela 6 - Perfil de aminoácidos das amostras de hidrolisado de cartilagem esternal de frango (g/100 g)

Aminoácido	Flavourzyme®	Alcalase®
Hidrofóbicos		
Serina	2,18 ^b ± 0,02	2,37 ^a ± 0,00
Glicina	6,17 ^b ± 0,08	7,56 ^a ± 0,07
Treonina	2,05 ^b ± 0,00	2,33 ^a ± 0,00
Alanina	3,36 ^b ± 0,02	4,01 ^a ± 0,03
Prolina	3,70 ^b ± 0,05	4,47 ^a ± 0,04
Tirosina	1,35 ^a ± 0,06	1,57 ^a ± 0,00
Valina	2,23 ^b ± 0,03	2,48 ^a ± 0,04
Metionina	1,13 ^b ± 0,01	1,42 ^a ± 0,05
Isoleucina	1,88 ^b ± 0,02	2,08 ^a ± 0,01
Leucina	3,15 ^b ± 0,00	3,71 ^a ± 0,00
Fenilalanina	1,56 ^b ± 0,01	1,83 ^a ± 0,09
Triptofano	0,42 ^a ± 0,01	0,38 ^a ± 0,02
Total	29,18 ^b ± 0,06	34,21 ^a ± 0,05
Hidrofílicos		
Lisina*	2,81 ^b ± 0,05	3,49 ^a ± 0,03
Cistina	0,57 ^b ± 0,01	0,73 ^a ± 0,02
Histidina*	2,89 ^a ± 0,04	3,02 ^a ± 0,02
Arginina*	3,63 ^b ± 0,02	4,31 ^a ± 0,02
Ácido Aspártico	4,10 ^b ± 0,01	4,88 ^a ± 0,00
Ácido Glutâmico	7,06 ^b ± 0,02	8,22 ^a ± 0,01
Total	21,06 ^b ± 0,03	24,65 ^a ± 0,02
Razão triptofano:LNAA	0,041 ^a ± 0,002	0,032 ^b ± 0,003

^{a,b}Letras diferentes na mesma coluna indicam diferença estatisticamente significativa pelo teste t-Student (p < 0,05); *aminoácidos com caráter básico (carregados positivamente).

Fonte: dados obtidos pela pesquisadora (2023)

Um total de 18 aminoácidos foram identificados para as duas amostras analisadas, sendo 6 destes hidrofílicos e 12 destes hidrofóbicos. Nota-se que o teor de cada um dos aminoácidos foi maior para a amostra hidrolisada com Alcalase®, sendo esta diferença estatisticamente significativa (p < 0,05). Os aminoácidos histidina, tirosina e triptofano tiveram resultados estatisticamente iguais (p > 0,05) para os dois tratamentos. Bezerra *et al.* (2020) que hidrolisaram misturas de cristas e barbelas do frango também encontraram uma maior quantidade de aminoácidos hidrofóbicos (48,12 g/100g) do que hidrofílicos (24,56 g/100g). Os autores ainda destacam que os ácidos aspártico e glutâmico apresentam capacidade quelante, conferindo atividade antioxidante relacionada à formação de complexos com íons metálicos. Apesar de estatisticamente a amostra hidrolisada com Alcalase® apresentar maior teor (Tabela 6) destes dois aminoácidos hidrofílicos (p < 0,05) a capacidade antioxidante determinada por FRAP para os dois hidrolisados foi estatisticamente igual (Tabela 4).

Com relação à atividade de inibição da AChE, no estudo realizado por Moreira *et al.* (2022), a avaliação por *docking* molecular demonstrou que aminoácidos básicos (hidrolisados proteicos de peixe) têm maior afinidade de ligação à enzima. Na Tabela 6, os aminoácidos de caráter básico (carregados positivamente) estão destacados (*) e nota-se que a amostra hidrolisada com Alcalase® possui um teor de arginina e lisina estatisticamente maior ($p < 0,05$). O aminoácido histidina foi determinado em quantidade estatisticamente semelhante ($p > 0,05$) para as duas amostras. Este resultado corrobora com a resposta da atividade de inibição da AChE pela amostra de hidrolisado produzido com Alcalase® (Tabela 5), apresentando maior percentual de inibição. Os aminoácidos com carga positiva foram parcialmente responsáveis pela promoção das capacidades inibitórias da AChE, demonstrando ser um fator chave para esta bioatividade.

O triptofano é o único precursor do neurotransmissor regulador do humor serotonina. Estudos mostraram que o aumento da serotonina no cérebro melhora humor, reduz os distúrbios emocionais em indivíduos saudáveis, e uma diminuição da serotonina no cérebro causa depressão e ansiedade (Kikuchi *et al.*, 2021). A biossíntese da serotonina no cérebro depende da disponibilidade de triptofano que, por sua vez, depende da proporção de outros aminoácidos neutros de maior massa (ou aminoácidos neutros de cadeia longa, *Large Neutral Amino Acids*, LNAA), especificamente leucina, isoleucina, valina, fenilalanina e tirosina. Assim, o consumo de suplementos com uma proporção relativamente alta de triptofano:LNAA pode levar a melhores resultados pós-consumo em relação ao humor, do que de suplementos somente de triptofano, graças às interações positivas entre os constituintes (Zahar *et al.*, 2022). Este efeito ocorre, pois, o triptofano compete com os outros LNAA no transporte através da barreira hematoencefálica (*Blood Brain Barrier*, BBB), então, aumentando a proporção de triptofano:LNAA há maior probabilidade do triptofano acessar os transportadores da BBB (TEMPLEMAN *et al.*, 2020).

Avaliando os resultados da Tabela 6, a razão de triptofano:LNAA (onde LNAA é a soma das quantidades de isoleucina, leucina, valina, fenilalanina e tirosina) pode ser observado que a amostra hidrolisada com Flavourzyme® apresenta uma razão significativamente maior ($p < 0,05$). No estudo realizado por Markus *et al.* (2008) o efeito da ingestão diferentes fontes proteicas nas concentrações plasmáticas de aminoácidos e na razão triptofano/LNAA plasmática foi avaliado em aproximadamente 600 estudantes da Universidade de Maastricht (Holanda). Os autores concluíram que após o consumo de hidrolisado proteico (PeptoBalance™, DSM, 0,8 g de triptofano e 4 g de LNAA) houveram aumentos significativamente mais rápidos e maiores na razão triptofano/LNAA plasmática do que após

a ingestão de alfa-lactalbumina *whey protein* (BioPURE, Davisco Foods International, com 0,8 g de triptofano e 9,4 g de LNAA).

6 CONCLUSÕES FINAIS

A cartilagem esternal teve composição centesimal analisada apresentando teor de proteínas adequado para ser utilizada como fonte de hidrolisado proteico. Sua hidrólise enzimática catalisada pela enzima Alcalase® resultou em maior rendimento de hidrólise, quando comparado ao resultado determinado para a catálise com a enzima Flavourzyme®.

O hidrolisado obtido a partir da cartilagem esternal de frango com Alcalase® apresentou maior capacidade antioxidante e maior inibição da enzima acetilcolinesterase. Contudo, o hidrolisado obtido com Flavourzyme® apresentou maior razão entre triptofano e aminoácidos neutros de cadeia longa (LNAA, *Large Neutral Amino Acids*), importante parâmetro a ser avaliado para a produção de serotonina. Estes resultados sugerem uma potencial aplicação da cartilagem de frango hidrolisada enzimaticamente no tratamento da doença de Alzheimer.

Desta forma, conclui-se que os hidrolisados obtidos apresentaram bioatividades promissoras e podem futuramente ser avaliados como aditivos alimentares e suplementos nutracêuticos. Um maior aprofundamento quanto a aplicações tecnológicas, como exemplo avaliação de propriedades emulsionantes, identificação do tamanho dos peptídeos, bem como, análises *in vivo* são sugeridas a partir das conclusões obtidas no presente trabalho.

REFERÊNCIAS

- AHMED, S.; KHAN, S. T.; ZARGAHAM, M. K.; KHAN, A. U.; KHAN, S.; HUSSAIN, A.; UDDIN, J.; KHAN, A.; AL-HARRASI, A. Potential therapeutic natural products against Alzheimer's disease with Reference of Acetylcholinesterase. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, [s. l.], v. 139, p. 111609, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2021.111609>. Acesso em: 26 jun. 2022.
- AHN, C. B.; LEE, K. H.; JE, J. Y. Enzymatic production of bioactive protein hydrolysates from tuna liver: effects of enzymes and molecular weight on bioactivity. **Internacional Journal of Food Science & Technology**. V.45.p.562-568. 2010. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.2009.02166.x>. Acesso em: 20 out .2022.
- AKRAM, A. N.; ZHANG, C. Extraction of collagen-II with pepsin and ultrasound treatment from chicken sternal cartilage; physicochemical and functional properties. **Ultrasonics Sonochemistry**, [s. l.], v. 6, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2019.125544> Acesso em: 8 jun. 2021.
- AKRAM, A. N.; ZHANG, C. Efeitos da ultrassonicação no rendimento, características funcionais e físico-químicas do colágeno-II da cartilagem esternal de frango. **Química de alimentos**, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2020.105053>. Acesso em: 10 out. 2022.
- ALOYSIUS, T.; CARVAJAL, A.; SLIZYTE, R.; SKORVE, J.; BERGE, R.; BJØRNDAL, B. Chicken Protein Hydrolysates Have Anti-Inflammatory Effects on High-Fat Diet Induced Obesity in Mice. **Medicines**, [s. l.], v. 6, n. 1, p. 5, 2018.
- ALUKO, R. E. Food-derived Acetylcholinesterase Inhibitors as Potential Agents against Alzheimer's Disease. **eFood**, [s. l.], v. 2, n. 2, p. 49–58, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.2991/efood.k.210318.001>. Acesso em: 10 out. 2022.
- ALVARES, T. S.; CONTE-JUNIOR, C. A.; PIERUCCI, A. P.; DE OLIVEIRA, G. V.; CORDEIRO, E. M. Acute effect of fish protein hydrolysate supplementation on vascular function in healthy individuals. **Journal of Functional Foods**, [s. l.], v. 46, n. December 2017, p. 250–255, 2018.
- ARAÚJO, Í. B., LIMA, D. A. S., PEREIRA, S. F., PASETO, R. P., & MADRUGA, M. S. Effect of storage time on the quality of chicken sausages produced with fat replacement by collagen gel extracted from chicken feet. **Poultry Science**, v. 100, n. 2, p. 1262-1272, 2021.
- AVIAN SCIENCE INSTITUTE. Disponível em: <https://www.avianscienceinstitute.com/>. Acesso em: 10 jul. 2022.
- BAO, Z.J., ZHAO, Y., WANG, X.Y., CHI, Y.J.. Effects of degree of hydrolysis (DH) on the functional properties of egg yolk hydrolysate with alcalase. **Food Sci Technol**, 54, 669–678, 2017. <https://doi.org/10.1007/s13197-017-2504-0>
- BHASKAR, N., SUDEEPA, E., RASHMI, H., & TAMILSELVI, A. Partial purification and characterization of protease of *Bacillus proteolyticus* CFR3001 isolated from fish processing

waste and its antibacterial activities. **Bioresource Technology**, 98(14), 2758–2764, 2007. doi:10.1016/j.biortech.2006.09.033

BERNARDI, D. M., PARIS, L. D. D., DIETERICH, F., BOSCOLO, W. R., SARY, C., SIGNOR, A., BERTOL, T. M., SGARBIERI, V. C. Production of hydrolysate from processed Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) residues and assessment of its antioxidant activity. **Food Science and Technology**, 36, 709-716, 2016.

BEZERRA, T.; ESTÉVEZ, M.; LACERDA, J. T.; DIAS, M.; JULIANO, M.; MENDES, M. A.; MORGANO, M.; PACHECO, M. T.; MADRUGA, M. Chicken Combs and Wattles as Sources of Bioactive Peptides: Optimization of Hydrolysis, Identification by LC-ESI-MS 2 and Bioactivity Assessment. **Molecules**, [s. l.], v. 25, p. 1698, 2020. Disponível em: www.mdpi.com/journal/molecules. Acesso em: 10 jan. 2023.

BORGES-CONTRERAS, B.; MARTÍNEZ-SÁNCHEZ, C. E.; HERMAN-LARA, E.; RODRÍGUEZ-MIRANDA, J.; HERNÁNDEZ-SANTOS, B.; JUÁREZ-BARRIENTOS, J. M.; GUERRA-ALMONACID, C. M.; BETANCUR-ANCONA, D. A.; TORRUCO-UCO, J. G. Angiotensin-Converting Enzyme Inhibition in Vitro by Protein Hydrolysates and Peptide Fractions from Mojarra of Nile Tilapia (*Oreochromis niloticus*) Skeleton. **Journal of Medicinal Food**, [s. l.], v. 22, n. 3, p. 286–293, 2019.

BORRAJO, P., PATEIRO, M., MUNEKATA, P. E., FRANCO, D., DOMÍNGUEZ, R., MAHGOUB, M., LORENZO, J. M. Pork liver protein hydrolysates as extenders of pork patties shelf-life. **International Journal of Food Science & Technology**, v. 56, n. 12, p. 6246-6257, 2021.

BRAND-WILLIAMS, W.; CUVELIER, M. E.; BERSET, C. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. **LWT - Food Science and Technology**, [s. l.], v. 28, n. 1, p. 25–30, 1995.

CAO, H.; SHI, F.X.; XU, F.; YU, J. S. Molecular structure and physicochemical properties of pepsin-solubilized type II collagem from the chick sternal cartilage. **European Review for Medical and Pharmacological Sciences**. V.17.p.1427-1437. 2013.

CAVALHEIRO, C. P., LÜDTKE, F. L., STEFANELLO, F. S., KUBOTA, E. H., TERRA, N. N., & FRIES, L. L. M. Replacement of mechanically deboned chicken meat with its protein hydrolysate in mortadella-type sausages. **Food Science and Technology**, v. 34, p. 478-484, 2014.

CHAI, X.; WU, K.; CHEN, C.; DUAN, X.; YU, H.; LIU, X. Physical and oxidative stability of chicken oil-in-water emulsion stabilized by chicken protein hydrolysates. **Food Science & Nutrition**, [s. l.], v. 8, n. 1, p. 371–378, 2020.

CHALAMAIAH, M., R. HEMALATHA, AND T. JYOTHIRMAYI. "Fish protein hydrolysates: proximate composition, amino acid composition, antioxidant activities and applications: a review. **Food Chemistry**, 135.4 : 3020-3038, 2012.

CHI, C., HU, F., LI, Z., WANG, B., & LUO, H.. Influence of Different Hydrolysis Processes by Trypsin on the Physicochemical, Antioxidant, and Functional Properties of Collagen

Hydrolysates from *Sphyrna lewini*, *Dasyatis akjei*, and *Raja porosa*. **Journal of Aquatic Food Product Technology**, 25(5), 616–632, 2015. doi:10.1080/10498850.2014.898004

CHOU, M. Y., CHEN, Y. J., LIN, L. H., NAKAO, Y., LIM, A. L., WANG, M. F., YONG, S. M. Protective effects of hydrolyzed chicken extract (Probeptigen®/Cmi-168) on memory retention and brain oxidative stress in senescence-accelerated mice. **Nutrients**, v. 11, n. 8, p. 1870, 2019.

DAMODARAN, S., PARKIN, K.L., FENNEMA, O.R. Química de alimentos de Fennema. 4a. ed. Porto Alegre (RS): **Artmed**; 2010.

DINIZ, F. M.; MARTIN, A. M. 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. **International Journal of Food Science & Technology**, v. 31, n. 5, p. 419-426, 1996.

DHAKAL, D.; KOOMSAP, P.; LAMICHHANE, A.; SADIQ, M. B.; ANAL, A. K. Optimization of collagen extraction from chicken feet by papain hydrolysis and synthesis of chicken feet collagen based biopolymeric fibres. **Food Bioscience**. V. 23.p.23–30. 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.fbio.2018.03.003>. Acesso em: 20 out. 2022.

DOUCET, D., DON, E.O., SYLVIE, F. G., FOEGEDING, A. Enzyme-Induced Gelation of Extensively Hydrolyzed Whey Proteins by Alcalase: Peptide Identification and Determination of Enzyme Specificity. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 2003.

DRYÁKOVÁ, A., PIHLANTO, A., MARNILA, P., ČURDA, L., & KORHONEN, H. J. T. Antioxidant properties of whey protein hydrolysates as measured by three methods. **European Food Research and Technology**, 2010. doi: <http://dx.doi.org/10.1007/s00217-010-1231-9>

ELLMAN, G. L.; COURTNEY, K. D.; ANDRES, V.; FEATHERSTONE, R. M. A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. **Biochemical Pharmacology**, [s. l.], v. 7, n. 2, p. 88–95, 1961.

FERRARO, V.; ANTON, M. & SANTÉ-LHOUELLIER, V. The “Sisters” α -Helices of Collagen, Elastin and Keratin Recovered from Animal By-Products: Functionality, Bioactivity and Trends of Application. **Trends in Food Science and Technology**, 51: 65-75, 2016.

FU, Y., LIU, J., HANSEN, E. T., BREDIE, W. L. P., & LAMETSCH, R. Structural characteristics of low bitter and high umami protein hydrolysates prepared from bovine muscle and porcine plasma. **Food Chemistry**, 257, 163–171, 2018. doi:10.1016/j.foodchem.2018.02.159

GHANI, M. A., BARRIL, C., BEDGOOD JR, D. R., PRENZLER, P. D. Measurement of antioxidant activity with the thiobarbituric acid reactive substances assay. **Food Chemistry**, v. 230, p. 195-207, 2017.

GÓMEZ-GUILLÉN, M. C., GIMÉNEZ, B., LÓPEZ-CABALLERO, M. E., & MONTERO, M. P. Functional and bioactive properties of collagen and gelatin from alternative sources: A review. **Food Hydrocolloids**, 25(8), 1813–1827, 2011. doi:10.1016/j.foodhyd.2011.02.007

- HAGEN, SR, FROST, B., & AUGUSTIN, J. (1989). Precolumn phenylisothiocyanate derivatization and liquid chromatography of amino acids in food. **Journal - Association of Official Analytical Chemists**, 72(6), 912–916.
- HALIM, N. R. A.; YUSOF, H. M.; SARBON, N. M. Functional and bioactive properties of fish protein hydrolysates and peptides: A comprehensive review. **Trends in Food Science & Technology**, [s. l.], v. 51, 2016.
- HANSEN, B. E. Sample splitting and threshold estimation. **Econometrica**, vol. 68, n. 3, p. 575-603, 2000.
- HAM, Y. K., SONG, D. H., NOH, S. W., GU, T. W., LEE, J. H., KIM, T. K., CHOI, YUN-SANG., KIM, H. W. Effects of gelatin hydrolysates addition on technological properties and lipid oxidation of cooked sausage. **Food Science of Animal Resources**, v. 40, n. 6, p. 1033, 2020.
- HARRIS, M.; POTGIETER, J.; ISHFAQ, K.; SHAHZAD, M.; EPPELL, S. J. Developments for Collagen Hydrolysate in Biological, Biochemical, and Biomedical Domains: A Comprehensive Review. **Materials**, [s. l.], v. 14, n. 2806, p. 3–39, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/ma14112806>. Acesso em: 20 out. 2022.
- HORAX, R.; VALLECIOS, M. S.; HETTIARACHCHY, OSORIO, L. F.; CHEN, P. Solubility, functional properties, ACE-I inhibitory and DPPH scavenging activities of Alcalase hydrolysed soy protein hydrolysates. **Food Science + Technology**. v.52. n.1. p.196-204. 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/ijfs.13267>. Acesso em: 20 out. 2022.
- HUANG, C.-Y.; TSAI, Y.-H.; HONG, Y.-H.; HSIEH, S.-L.; HUANG, R.-H. Characterization and Antioxidant and Angiotensin I-Converting Enzyme (ACE)-Inhibitory Activities of Gelatin Hydrolysates Prepared from Extrusion-Pretreated Milkfish (*Chanos chanos*) Scale. **Marine Drugs**, [s. l.], v. 16, n. 10, p. 346, 2018.
- HU, R., DUNMIRE, K. M., TRUELOCK, C. N., PAULK, C. B., ALDRICH, G., LI, Y. Antioxidant performances of corn gluten meal and DDGS protein hydrolysates in food, pet food, and feed systems. **Journal of Agriculture and Food Research**, v. 2, p. 100030, 2020.
- IDOWU, A. O.; FAMUWAGUN, A. A.; FAGBEMI, N.; ALUKO, R. E. Antioxidant and enzyme-inhibitory properties of sesame seed protein fractions and their isolate and hydrolyzate. **International Journal of Food Properties**. v.24. n.1. p.780-795. 2021. Disponível em: <https://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/10942912.2021.1919704>. Acesso em: 20 out. 2022.
- JEAMPAKDEE, P.; PUTHONG, S.; SRIMONGKOL, P.; SANGTANOO, P.; SAISAVOEY, T.; KARNCHANATAT, A. The apoptotic and free radical-scavenging abilities of the protein hydrolysate obtained from chicken feather meal. **Poultry Science**, [s. l.], v. 99, n. 3, p. 1693–1704, 2020.
- KARIM, A. A., & BHAT, R. Fish gelatin: properties, challenges, and prospects as an alternative to mammalian gelatins. **Food Hydrocolloids**, 23(3), 563–576, 2009. doi:10.1016/j.foodhyd.2008.07.002

KARIMI, A.; AZIZI, M. H.; GAVLIGHI, H. A. Fraktionation of hydrolysate from corn germ protein by ultrafiltration: in vitro antidiabetic and antioxidante activity. **Food Science & Nutrition**. v.8. p.2395-2405. 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1002/fsn3.1529>. Acesso em: 28 out. 2022.

KIKUCHI, A. M., TANABE, A.; IWAHORI, Y. A systematic review of the effect of L-tryptophan supplementation on mood and emotional functioning. **Journal of Dietary Supplements**. 18(3), 316–333. 2021.

KIM, S. S.; AHN, C. B.; MOON, S. W.; JE, J. Y. Purification and antioxidant activities of peptides from sea squirt (*Halocynthia roretzi*) protein hydrolysates using pepsin hydrolysis. **Food Bioscience**, [s. l.], v. 25, n. February, p. 128–133, 2018.

KIM, D.; KIM, Y. H. B.; HAM, J.-S.; LEE, S. K.; JANG, A. Pig Skin Gelatin Hydrolysates Attenuate Acetylcholine Esterase Activity and Scopolamine-induced Impairment of Memory and Learning Ability of Mice. **Food Science of Animal Resources**, [s. l.], v. 40, n. 2, p. 183–196, 2019.

KLOMPONG, V.; BENJAKUL, S.; KANTACHOTE, D., HAYES, K. D., SHAHIDI, F. Comparative study on antioxidative activity of yellow stripe trevally protein hydrolysate produced from Alcalase and Flavourzyme. **International Journal of Food Science & Technology**, v. 43, n. 6, p. 1019-1026, 2008.

KREMSMAYR, T.; ALJNABI, A.; BLANCO-CANOSA, J. B.; TRAN, H. N.T.; EMIDIO, N.B. e MUTTENTHALER, M. On the Utility of Chemical Strategies to Improve Peptide Gut Stability. **Journal of Medicine Chemistry**, 6191-6206, 2022.

KRISTOFFERSEN, K. A.; AFSETH, N. K.; BOCKER, U.; LINDBERG, D.; BOSCH, H. V. V.D.; RUUD, M. L.; WUBSHET, S. G. Average molecular weight, degree of hydrolysis and dry-film FTIR fingerprint of milk protein hydrolysates: intercorrelation and application in process monitoring. **Journal pre-proofs**. 125800. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2019.125800>. Acesso em: 21 out. 2022.

KORKMAZ, K.; TOKUR, B. Optimization of hydrolysis conditions for the production of protein hydrolysates from fish wastes using response surfasse methodology. **Journal pre-proofs**. 101312. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.fbio.2021.101312>. Acesso em: 23 out. 2022.

LEDWARD, D.A. Gelation of gelatin. In: *Functional Properties of Food Macromolecules*, MITCHELL, J.R. and LEDWARD, D.A. eds, **Elsevier Applied Science**, London, 1986, pp. 171-174.

LI, Q.; YANG, H.; CHEN, Y.; SUN, H. Recent progress in the identification of selective butyrylcholinesterase inhibitors for Alzheimer's disease. **European Journal of Medicinal Chemistry**, [s. l.], v. 132, p. 294–309, 2017.

LIMA, K. O., QUADROS, C. C., ROCHA, M., JOCELINO, J. T., LACERDA, G., JULIANO, M. A., DIAS, M., PRENTICE, C. Bioactivity and bioaccessibility of protein hydrolyzates from industrial byproducts of Stripped weakfish (*Cynoscion guatucupa*). **LWT - Food Science Technology**, 2019. doi:10.1016/j.lwt.2019.05.043

- LIN, X.; YANG, L.; WANG, M.; ZHANG, T.; LIANG, M.; YUAN, E.; REN, J. Preparation, purification and identification of cadmium-induced osteoporosis-protective peptides from chicken sternal cartilage. **Journal of Functional Foods**, [s. l.], v. 51, p. 130–141, 2018. Disponível em: Acesso em: 8 jun. 2021.
- LIU, Y.; YAN, B.; WINKLER, D. A.; FU, J.; ZHANG, A. Correction to Competitive Inhibition Mechanism of Acetylcholinesterase without Catalytic Active Site Interaction: Study on Functionalized C 60 Nanoparticles via in Vitro and in Silico Assays. **ACS Appl. Mater. Interfaces**, [s. l.], v. 2017, n. 22, p. 16, 2017. Disponível em: www.acsami.org.
- LOWRY, O. H.; ROSEBROUGH, NiraJ.; FARR, A. L.; RANDALL, RoseJ. PROTEIN MEASUREMENT WITH THE FOLIN PHENOL REAGENT. **Journal of Biological Chemistry**, [s. l.], v. 193, n. 1, 1951.
- LUTZ, I. A. **Métodos físico-químicos para análise de alimentos**. São Paulo: Instituto Adolfo Lutz, [s. l.], 2008.
- MA, C.; YU, M.; HUANG, Z.; WANG, J.; ZHAO, X.; KANG, C.; XU, H.; WANG, Y.; HOU, H. Oral administration of hydrolysates of cartilage extract in the prevention of osteoarthritis. *Journal of Functional Foods*, [s. l.], v. 78, p. 104376, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.jff.2021.104376> . Acesso em: 8 jun. 2021.
- MALOMO, SUNDAY A.; ALUKO, ROTIMI E. In vitro acetylcholinesterase-inhibitory properties of enzymatic hemp seed protein hydrolysates. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v. 93, n. 3, p. 411-420, 2016.
- MARKUS, C. R., FIRK, C., GERHARDT, C., KLOEK, J.; SMOLDERS, G. F. Effect of different tryptophan sources on amino acids availability to the brain and mood in healthy volunteers. **Psychopharmacology**. 201(1), 107–114. 2008.
- MARTINS, C. A. F.; MIGUEL, M. D.; ZANIN, S. M. W. Utilização de material colagenoso e gorduroso extraído de peles de frango na indústria alimentícia, cosmética e de sabão. **Visão Acadêmica**. Curitiba, v.10, n.2, jul./dez, 2009.
- MELO, D. de C.; ALCÂNTARA, R. L. C. Desafios identificados na Gestão da Demanda em cadeias de suprimentos agroalimentares. In: **XVI Simpósio de Engenharia de Produção, Botucatu**. 2009. Anais. Botucatu, SP, 2009.
- MENÉNDEZ-HELMAN, R. J.; FERREYROA, G. v.; DOS SANTOS AFONSO, M.; SALIBIÁN, A. Circannual rhythms of acetylcholinesterase (AChE) activity in the freshwater fish *Cnesterodon decemmaculatus*. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, [s. l.], v. 111, p. 236–241, 2015.
- MIN, L.-J.; KOBAYASHI, Y.; MOGI, M.; TSUKUDA, K.; YAMADA, A.; YAMAUCHI, K.; ABE, F.; IWANAMI, J.; XIAO, J.-Z.; HORIUCHI, M. Administration of bovine casein-derived peptide prevents cognitive decline in Alzheimer disease model mice. **PLOS ONE**, [s. l.], v. 12, n. 2, 2017.
- MOREIRA, T. F. M.; PESSOA, L. G. A.; SEIXAS, F. A. V.; INEU, R. P.; GONÇALVES, O. H.; LEIMANN, F. V.; RIBEIRO, R. P. Chemometric evaluation of enzymatic hydrolysis in the production of fish protein hydrolysates with acetylcholinesterase inhibitory activity. **Food Chemistry**, [s. l.], v. 367, p. 130728, 2022.

MOSS, D. E. Improving Anti-Neurodegenerative Benefits of Acetylcholinesterase Inhibitors in Alzheimer's Disease: Are Irreversible Inhibitors the Future? **International Journal of Molecular Sciences**, [s. l.], v. 21, p. 3438, 2020. Disponível em: www.mdpi.com/journal/ijms.

D. L. Nelson and M. C. Cox, W. H. Lehninger: principles of biochemistry (4th edn), **Freeman & Co.**, New York, 1119 pp (plus 17 pp glossary), 2004.

NEPOMUCENO, E. F. V. Obtenção de hidrolisados proteicos de tilápia vermelha (*Oreochromis niloticus* var.), atividade antioxidante e eficiência como fonte suplementar de nitrogênio para bioprocessos. 2018. Piracicaba, SP, 2018.

NWACHUKWU, IFEANYI D.; ALUKO, ROTIMI E. Structural and functional properties of food protein-derived antioxidant peptides. **Journal of Food Biochemistry**, v. 43, n. 1, p. e12761, 2019.

OCKERMAN, H.W., HANSEN, C. L ANIMAL By-Product Processing and Utilization, Technomic Pub. ed. 1 Co, Inc., Lancaster, PA., 2000.

OLIVEIRA LIMA, K.; ALEMÁN, A.; LÓPEZ-CABALLERO, M. E.; GÓMEZ-GUILLÉN, M. del C.; MONTERO, M. P.; PRENTICE, C.; TAÍPE HUISA, A. J.; MONSERRAT, J. M. Characterization, stability, and in vivo effects in *Caenorhabditis elegans* of microencapsulated protein hydrolysates from stripped weakfish (*Cynoscion guatucupa*) industrial byproducts. **Food Chemistry**, [s. l.], v. 364, p. 130380, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2021.130380>. Acesso em: 26 jun. 2022.

ONUJ, J. O.; ALUKO, R. E. Metabolomics as a tool to study the mechanism of action of bioactive protein hydrolysates and peptides: A review of current literature. [S. l.]: **Elsevier Ltd**, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2019.08.002>. Acesso em: 8 jun. 2021.

PADILHA, A. C. M.; LEAVY, S.; SAMPAIO, A.; JERÔNIMO, F. B. Gestão ambiental de resíduos da produção na Perdigão Agroindustrial S/A - Unidade Industrial de Serafina Corrêa- RS. **XLIII Congresso da Sober, Ribeirão Preto**, 2005. **Anais**. Ribeirão Preto, SP, 2005.

PAN, X.; ZHAO, Y. Q.; HU, F.Y.; WANG, B. Preparation and identification of antioxidant peptides from protein hydrolysate of skate (*raja porosa*) cartilage. **ScienceDirect**. v.25. p.220-230. 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.jff.2016.06.008>. Acesso em: 22 out. 2022.

PANTOJA, T.; KUBOTA, M.; SUWANNAPORN, P.; KADOWAKI, M. Characterization and bioactivities of young rice protein hydrolysates. **Journal of Cereal Science**. v.95. 103049. 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.jcs.2020.103049>. Acesso em: 22 out. 2022.

PATINO, M. G.; NEIDERS, MIRDZA E.; ANDREANA, S.; NOBLE, B.; C, R. E. Collagen: An Overview. **Implant Dentistry**.11 (3):p 280-285, Set. 2002.

PEÑA-RAMOS, E. A., & XIONG, Y. L. Whey and soy protein hydrolysates inhibit lipid oxidation in cooked pork patties. **Meat Science**, 64(3), 259–263, 2003. doi:10.1016/s0309-1740(02)00187-0

PRAMUALKIJA, T.; PIRAK, T.; EUSTON, S. R. Valorization of chicken slaughterhouse by-products: production and properties of chicken trache hydrolysates using commercial proteases. **International Journal of Food Properties**. v.24. n.1. p.1642-1657. 2021.

Disponível em: <https://www.tandfonline.com/doi/pdf/10.1080/10942912.2021.1.> Acesso em: 22 out. 2022.

PHIPPS, K. R.; LEE, H. Y.; KIM, H.; JEON, B. Oral administration of a novel hydrolyzed chicken sternal cartilage extract (BioCell Collagen®) reduces UVB-induced photoaging in mice. **Journal of Functional Foods**, [s. l.], v. 68, p. 103870, 2020.

RAJU, A. A.; ROSE, C.; MURALIDHARA RAO, N. Enzymatic hydrolysis of tannery fleshings using chicken intestine proteases. **Animal Feed Science Technology**. v. 66, p. 139–147, 1997.

ROCHA, F.; SUGAHARA, L. Y.; LEIMANN, F. V.; OLIVEIRA, S. M. de; BRUM, E. da S.; CALHELHA, R. C.; BERREIRO, M. F.; FERREIRA, I. C. F. R.; INEU, R. P.; GONÇALVES, O. H. Nanodispersions of beta-carotene: effects on antioxidant enzymes and cytotoxic properties. **Food and Function**. [s. l.], p. 1–30, 2018.

SANTOS, S.D., MARTINS, V.G., SALAS-MELLADO, M. Evaluation of Functional Properties in Protein Hydrolysates from Bluewing Searobin (*Prionotus punctatus*) Obtained with Different Microbial Enzymes. **Food Bioprocess Technol** 4, 1399–1406, 2011. <https://doi.org/10.1007/s11947-009-0301-0>.

SEO, HYUN-WOO; SEO, JIN-KYU; YANG, HAN-SUL. Supplementation of pork patties with bovine plasma protein hydrolysates augments antioxidant properties and improves quality. **Korean Journal for Food Science of Animal Resources**, v. 36, n. 2, p. 198, 2016.

SHMIDT, C. G., & SALAS-MELLADO, M., Influência da ação das enzimas alcalase e flavourzyme no grau de hidrólise das proteínas de carne de frango. **Química Nova**, 2009. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/S0100-40422009000500012>.

SCHRIEBER, R. and GAREIS, H. *Gelatine Handbook: Theory and Industrial Practice*. **WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA**, Weinheim ISBN: 978-3-527-31548-2, 2007.

SCHMIDT, M. M.; FONTOURA, A. M.; VIDAL, A. R.; DORNELLES, R. C. P.; KUNOTA, E. H.; MELLO, R. O.; CANSIAN, R. L.; DEMIATE, I. M.; OLIVEIRA, C. S. Characterization of hydrolysates of collagen from mechanically separated chicken meat residue. **Food Science and Technology**. v.40. sup.1. p.355-362. Jun. 2020. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/cta/a/7J8h4jzKD9NGYNdng3Dbgfz/?format=pdf&lang=en>. Acesso em: 20 out. 2022.

SHEN, Q; ZHANG, C.; JIA, W.; QIN, X.; CUI, Z.; MO, H.; RICHEL, A. Co-production of chondroitin sulfate and peptide from liquefied chicken sternal cartilage by hot-pressure. **Carbohydrate polymers**. V.222. 115015. 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2019.115015>. Acesso em: 10 out. 2022.

SILVA, T.F., PENNA, A.L.B. Colágeno: Características químicas e propriedades funcionais. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, v. 71, n. 3, p. 530-9, 2012.

SUN, Y., PAN, D., GUO, Y., & LI, J. Purification of chicken breast protein hydrolysate and analysis of its antioxidant activity. **Food and Chemical Toxicology**, v. 50, n. 10, p. 3397-3404, 2012. Acesso em: 25 out. 2022.

TEMPLEMAN, J. R.; THORNTON, E.; CARGO-FROOM, C.; SQUIRES, E. J.; SWANSON, K. S.; SHOVELLER, A. K. Effects of incremental exercise and dietary tryptophan supplementation on the amino acid metabolism, serotonin status, stool quality, fecal metabolites, and body composition of mid-distance training sled dogs. **Journal of Animal Science**, 98(5). 2020.

THAIPONG, K.; BOONPRAKOB, U.; CROSBY, K.; CISNEROS-ZEVALLOS, L.; HAWKINS BYRNE, D. Comparison of ABTS, DPPH, FRAP, and ORAC assays for estimating antioxidant activity from guava fruit extracts. **Journal of Food Composition and Analysis**, [s. l.], v. 19, n. 6-7, p. 669-675, 2006.

YU, Z.; JI, H.; SHEN, J.; KAN, R.; ZHAO, W.; LI, J.; DING, L.; LIU, J. Cite this: Food Funct. **Food & Funct**, [s. l.], v. 11, p. 6643, 2020. Disponível em: <http://bioware.ucd.ie>. Acesso em: 10 out. 2022.

WANG, D.; SHAHIDI, F. Protein hydrolysate from turkey meat and optimization of its antioxidant potential by response surface methodology. **Poultry Science**, [s. l.], v. 97, n. 5, p. 1824-1831, 2018.

WANG, Z.; LIU, X.; XIE, H.; LIU, Z.; RAKARIYATHAM, K.; YU, C.; SHAHIDI, F.; ZHOU, D. Antioxidant activity and functional properties of Alcalase-hydrolyzed scallop protein hydrolysate and its role in the inhibition of cytotoxicity in vitro. **Food Chemistry**, [s. l.], v. 344, n. January 2020, p. 128566, 2021.

WARD, A. G. & COURTS, A., Eds. (1977). *The Science and Technology of Gelatin*; Academic Press: London.

WHITE, J.A., HART, R.J., & FRY, J.C. Uma avaliação do sistema Waters Pico-Tag para a análise de aminoácidos de materiais alimentares. **Journal of Automatic Chemistry**, 1986.

XU, Y.; GALANOPOULOS, M.; SISMOUR, E.; REN, S.; MERSHA, Z.; LYNCH, P.; ALMUTAIMI, A. Efeito da hidrólise enzimática usando endo- e exo-proteases na estrutura secundária, propriedades funcionais e antioxidantes de hidrolisados de proteína de grão de bico. **Jornal de medição e caracterização de alimentos**. V.14.p.343-352. 2020. Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1007/s11694-019-00296-0>. Acesso em: 26 out. 2022.

YAGHOUBZADEH, Z.; PEYRAVII GHADIKOLAI, F.; KABOOSI, H.; SAFARI, R.; FATTAHI, E. Antioxidant Activity and Anticancer Effect of Bioactive Peptides from Rainbow Trout (*Oncorhynchus mykiss*) Skin Hydrolysate. **International Journal of Peptide Research and Therapeutics**, [s. l.], v. 26, n. 1, p. 625-632, 2020.

YANG, J.; HUANG, J.; DONG, X.; ZHANG, Y.; ZHOU, X.; HUANG, M.; ZHOU, G. Purification and identification of antioxidant peptides from duck plasma proteins. **Food Chemistry**, [s. l.], v. 319, n. February, p. 126534, 2020.

YARNPAKDEE, S.; BENJAKUL, S.; KRISTINSSON, H. G.; KISHIMURA, H. Antioxidant and sensory properties of protein hydrolysate derived from Nile tilapia (*Oreochromis*

niloticus) by one- and two-step hydrolysis. **Journal of Food Science and Technology**, [s. l.], v. 52, n. 6, p. 3336–3349, 2014.

ZAHAR, S.; SCHNEIDER, N.; MAKWANA, A.; CHAPMAN, S.; CORTHESEY, J.; AMICO, M.; HUDRY, J. Dietary tryptophan-rich protein hydrolysate can acutely impact physiological and psychological measures of mood and stress in healthy adults. **Nutritional Neuroscience**, 1–10. 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.1080/1028415X.2022.2047435>. Acesso em: 10 jan. 2023.

ZHANG, X., ZHANG, Y., DONG, Y., DING, H., CHEN, K., LU, T., DAI, Z. Study on the mechanism of protein hydrolysate delaying quality deterioration of frozen surimi. **LWT - Food Science and Technology**, v. 167, p. 113767, 2022.

ZHAO, T.; XU, J.; ZHAO, H.; JIANG, W.; GUO, X.; ZHAO, M.; SUN-WATERHOUSE, D.; ZHAO, Q.; SU, G. Antioxidant and anti-acetylcholinesterase activities of anchovy (*Coilia mystus*) protein hydrolysates and their memory-improving effects on scopolamine-induced amnesia mice. **Food Science and Technology**. v.52. ed. 2. Dez. 2016.

ZHOU, C.; LI, Y.; YU, X.; YANG, H.; MA, H.; YAGOUB, A. E. A.; CHENG, Y.; HU, J.; OTU, P. N. Y. Extraction and characterization of chicken feet soluble collagen. **LWT-Food Science and Technology**. v. 74, p. 145-153, 2016.