

UNIVERSIDADE DO VALE DO ITAJAÍ

CARLA CAMILA BAZI

**PRODUÇÃO DE HIDROLISADO DE COLÁGENO DA ÁGUA-VIVA
Rhacostoma atlanticum, OCORRENTE NA FAUNA ACOMPANHANTE DA
PESCA**

Orientador: Prof. Dr. Marcos Luiz Pessatti
Co-orientador: Prof. Dr. Charrid Resgalla Jr.

ITAJAÍ
2018

UNIVERSIDADE DO VALE DO ITAJAÍ – UNIVALI
ESCOLA DO MAR, CIÊNCIA E TECNOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA
AMBIENTAL - PPGCTA

**PRODUÇÃO DE HIDROLISADO DE COLÁGENO DA ÁGUA-VIVA
Rhacostoma atlanticum, OCORRENTE NA FAUNA ACOMPANHANTE DA
PESCA**

CARLA CAMILA BAZI

Trabalho de Conclusão apresentado ao
Programa de Pós-Graduação em Ciência e
Tecnologia Ambiental, como parte dos requisitos
para obtenção do grau de Mestre em Ciência e
Tecnologia Ambiental.

Orientador: Prof. Dr. Marcos Luiz Pessatti

Co-orientador: Prof. Dr. Charrid Resgalla Jr.

ITAJAÍ
2018

DEDICATÓRIA

Aos meus pais, irmã e sobrinha!

AGRADECIMENTOS

Gostaria de agradecer aos meus pais, por me dar a oportunidade de escolher uma carreira e me apoiar incondicionalmente, sempre pensando e esperando o meu melhor;

A minha irmã, sobrinha e meu namorado, Gregor, pela companhia e apoio, que foram fundamentais, principalmente nos períodos mais conturbados desta jornada;

Aos meus orientadores, prof. Dr Marcos Luiz Pessatti e prof. Dr. Charrid Resgalla Jr., por todos os ensinamentos, paciência, dedicação e respeito com os quais me trataram durante todos os anos em que trabalhamos juntos;

Ao prof. Dr. Rogério Correa e ao Dionatan, por disponibilizar tempo e o equipamento de FTIR para análise das minhas amostras;

A todos os colegas de laboratório, Bioquímica, Letox, Biotec Básica, Genética e Química Orgânica. Aos que já foram para outras jornadas e aos que ainda estão no laboratório, trabalhando em suas pesquisas;

A todos os professores que contribuíram para minha formação acadêmica;

E a banca avaliadora deste trabalho, que doou um pouco do seu tempo e conhecimento para melhorar este trabalho.

Sumário

PRODUÇÃO DE HIDROLISADO DE COLÁGENO DA ÁGUA-VIVA <i>Rhacostoma atlanticum</i> , OCORRENTE NA FAUNA ACOMPANHANTE DA PESCA.....	i
PRODUÇÃO DE HIDROLISADO DE COLÁGENO DA ÁGUA-VIVA <i>Rhacostoma atlanticum</i> , OCORRENTE NA FAUNA ACOMPANHANTE DA PESCA.....	ii
AGRADECIMENTOS.....	iv
LISTA DE FIGURAS	vii
LISTA DE TABELAS	viii
RESUMO	ix
INTRODUÇÃO GERAL	1
OBJETIVOS	2
Objetivo geral	2
Objetivos específicos	2
CAPÍTULO I.....	3
COLÁGENO DE ÁGUAS-VIVAS: DO BYCATCH À ATIVIDADE ANTIOXIDANTE	3
1. INTRODUÇÃO	2
1.1 Pesca e bycatch.....	3
1.2 Colágeno.....	6
1.3 Produção industrial de colágeno	11
1.4 Colágeno de medusas	14
Atividades biológicas do colágeno de origem marinha e seus hidrolisados	17
2. CONCLUSÕES.....	21
3. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	21
CAPÍTULO II	35
PRODUÇÃO DE HIDROLISADO DE COLÁGENO DA ÁGUA-VIVA <i>Rhacostoma atlanticum</i> , OCORRENTE NA FAUNA ACOMPANHANTE DA PESCA.....	35
1. RESUMO	36
3. INTRODUÇÃO	37
4. MATERIAIS E MÉTODOS.....	40
4.1 Obtenção da matéria prima	40
4.2 Extração do colágeno íntegro à frio (ASC)	40
4.3 Produção do colágeno solúvel em pepsina (PSC)	41
4.4 Produção do hidrolisado proteico de medusas (HP) por meio físico-químico	42
4.5 Caracterização bioquímica.....	42
4.5.1 Determinação de proteínas solúveis	42
4.5.2 Eletroforese SDS-PAGE	42
4.5.3 Espectroscopia em infravermelho	43

4.6	Caracterização bioquímica do hidrolisado proteico	43
4.6.1	Capacidade de absorção de água e de óleo	43
4.6.2	Atividade antioxidante	43
4.6.2.1	Radical DPPH	44
4.6.2.2	Radical ABTS	44
4.6.2.3	Compostos fenólicos	44
5.	RESULTADOS	44
5.1	Extração dos colágenos íntegros	44
5.2	Produção do colágeno solúvel em pepsina (PSC)	45
5.3	Produção do Hidrolisado Proteico de medusas (HP)	46
5.4	Teor de Proteínas solúveis	46
5.5	Eletroforese SDS-PAGE	46
5.6	Espectrometria em Infravermelho com Transformada de Fourier	48
5.7	Atividade antioxidante	52
6.	DISCUSSÃO	54
7.	CONCLUSÕES	63
8.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	63

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO I

Figura 1 - Processo de formação, organização e estrutura do colágeno.....8

CAPÍTULO II

Figura 1- Desenho esquemático do procedimento de obtenção do colágeno solúvel em ácido (ASC)..... 43

Figura 2- SDS-PAGE de proteínas das amostras de hidrolisado proteico bruto e de colágeno solúvel em pepsina (PSC). Amostras (6 mg/ml) aplicadas em stacking 4%, resolvidas em gel de poliacrilamida 7,5% e reveladas com Coomassie Brilliant Blue. (1) Padrão, (2) Hidrolisado Bruto, (3) PSC extraído com 0,9 M de NaCl, (4) PSC extraído com 2 M de NaCl e (5) etanol 3 volumes. 47

Figura 3- SDS-PAGE de proteínas e peptídeos das amostras de hidrolisado proteico bruto e de colágeno solúvel em pepsina (PSC). Amostras aplicadas em stacking 4%, resolvidas em gel de poliacrilamida 10 e 16% e reveladas com Coomassie Brilliant Blue. (1) Padrão BioRad, (2) Hidrolisado Bruto, (3) PSC extraído com 0,9 M de NaCl, (4) PSC extraído com 2 M de NaCl e (5) etanol 3 volumes. 47

Figura 4- Espectro de transmitância da análise de FTIR entre as amostras ASC para os diferentes tratamentos de precipitação (Azul: ASC extraído com NaCl 0,9 M. Cinza: ASC extraído com NaCl 2 M. Verde: ASC extraído com etanol 3 volumes)... xlix

Figura 5- Espectro de transmitância da análise de FTIR entre as amostras PSC para os diferentes tratamentos de precipitação (Vermelho: PSC extraído com NaCl 0,9 M. Verde: PSC extraído com NaCl 2 M. Cinza: PSC extraído com etanol 3 volumes)... l

Figura 6- Espectro de transmitância em FTIR da amostra do hidrolisado proteico.....li

Figura 7- Atividade antioxidante mensurada pela captura do radical ABTS⁺. (A) Amostras de hidrolisado bruto proteico 1mg/ml e (B) 6mg/ml. 53

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO I

Tabela 1 - Principais tipos de colágeno e sua distribuição tecidual.....	7
---	---

CAPÍTULO II

Tabela 1 - Rendimentos das extrações do colágeno nativo, para os diferentes tratamentos de precipitação, e hidrolisado proteico. Matéria prima inicial seca (MPS) e matéria prima inicial úmida (MPU).....	45
---	----

Tabela 2 - Rendimentos das amostras de colágeno solúvel em pepsina (PSC) em relação ao colágeno solúvel em ácido (ASC) e em relação a matéria prima inicial seca (MPS).....	46
--	----

Tabela 3 Resultados da análise de compostos fenólicos. (a) Resultados do hidrolisado proteico em diferentes concentrações e (b) PSC nos diferentes tratamentos de precipitação na concentração de 6 mg/ml.	53
--	----

RESUMO

A utilização de proteínas colagenosas cresce à medida que se descobre seus potenciais usos na medicina, ciências de materiais e nutrição. A produção do colágeno de origem marinha têm trazido novas opções de obtenção deste material, bem como demonstrado atividades biológicas relevantes para a indústria. Neste trabalho, é apresentado um panorama geral sobre as capturas acessórias e alguns exemplos do aproveitamento dos organismos capturados de forma não intencional, como fonte de colágeno, bem como a extração e produção de hidrolisados de colágeno de águas-vivas e os estudos envolvendo suas atividades biológicas. Além disso, a fim de investigar as potencialidades do colágeno de águas-vivas, neste trabalho foi desenvolvido um protocolo de produção de hidrolisado proteico da medusa *Rhacostoma atlanticum* sob alta temperatura e pressão, e a extração do colágeno solúvel em ácido (ASC) a partir de três procedimentos de precipitação, com NaCl 0,9 M, 2M e etanol. Estes precipitados foram, em separado, submetidos a hidrólise com pepsina, gerando a respectiva fração solúvel em pepsina (PSC). O efeito de alta pressão e temperatura sobre o perfil de distribuição de pesos moleculares dos hidrolisados, por SDS-PAGE, foi considerado de uma hidrólise parcial. Já nos colágenos solúveis em pepsina, foi possível observar a presença de bandas representativas das cadeias $\alpha 2$ do colágeno tipo I, bem como os pesos moleculares dos peptídeos. Foi determinada atividade de captura do radical ABTS no hidrolisado apenas em tempos maiores de reação (36 minutos). A presença de compostos fenólicos, provavelmente gerados durante o processo de hidrólise, sugerem o potencial antioxidante do hidrolisado, que precisa ser confirmado por outras metodologias e por ensaios *in vivo*, a fim de avaliar a atuação destes antioxidantes em sistemas biológicos.

Palavras-chave: bycatch, peptídeos, medusas, antioxidantes

ABSTRACT

Use of collagenous proteins grows as their potential uses in medicine, materials science and nutrition are discovered. The production of marine-derived collagen has brought new options for obtaining this material, as well as demonstrated biological activities relevant to the industry. In this work, an overview is presented on the by catch and utilization of these organisms as source of collagen, the extraction and production of

hydrolysates of collagen from jellyfish and the studies involving their biological activities. In addition, in order to investigate the potentialities of jelly collagen, a protocol was developed for the production of protein hydrolysate from *Rhacostoma atlanticum* jellyfish under high temperature and pressure, extraction of collagen in acid (ASC) and precipitation with NaCl 0.9 M, 2M and ethanol. These precipitates were separately submitted to hydrolysis with pepsin, generating the respective pepsin soluble fraction (PSC). The effect of hydrolysis at high pressure and temperature on the production of the hydrolysate, determined by the molecular weight distribution, through SDS-PAGE, was considered a partial hydrolysis. In the pepsin-soluble collagens, it was possible to observe presence of representative bands of type I collagen $\alpha 2$ chains. It was determined the ABTS radical capture activity in the hydrolysate only at higher reaction times (36 minutes). The presence of phenolic compounds, probably generated during the hydrolysis process, reinforces antioxidant potential of the hydrolysate, which must be confirmed by other methodologies and by *in vivo* assay, in order to evaluate the performance of these antioxidants in biological systems.

Key words: collagen, peptides, jellyfish, antioxidants

INTRODUÇÃO GERAL

O uso de colágeno e seus derivados cresce nos últimos anos em virtude da sua importância benéfica ao organismo. Como proteína estrutural, o colágeno tem diversas funções no corpo humano, como manter as células dos tecidos unidas e fortalecê-las; também é responsável pela cicatrização ou regeneração em caso de corte ou cirurgia, além de auxiliar na hidratação da pele e no retardamento do processo de envelhecimento humano (GONÇALVES et al., 2015). O colágeno é amplamente utilizado na indústria de alimentos, na produção de gelatinas e emulsificantes, bem como na área farmacêutica. No entanto, questões religiosas e de saúde têm colocado entraves na produção e comercialização do colágeno provindo de suínos e bovinos. A utilização de proteínas e biomoléculas provindas de resíduos de pescado e organismos capturados de forma não intencional têm aumentado, em decorrência dos impactos negativos gerados pela sobrepesca e pelo excesso de resíduos gerados pelas indústrias (BHAGWAT & DANDGE, 2018).

A pesca não intencional abrange organismos com baixo ou nenhum valor comercial e são capturados em artes de pesca não seletivas, sendo classificados como *by catch*. Estes organismos após a captura não sobrevivem ou estão feridos o suficiente para não sobreviver, sendo descartados no mar; dentre eles encontram-se as águas-vivas, reconhecidas pelos impactos na pesca e no turismo (HALL, 2000).

Este trabalho se propôs a discutir a utilização e potencialidades dos colágenos extraídos a partir de águas-vivas. Este trabalho está dividido em dois capítulos. O primeiro apresenta o estado-da-arte sobre colágeno de medusas e atividades biológicas derivadas, que podem gerar interesse para a saúde e para a indústria de alimentos. Já o segundo capítulo está voltado para a obtenção e produção de um hidrolisado proteico de medusas da espécie *Rhacostoma atlanticum*, de ocorrência no litoral de Santa Catarina, bem como a extração do colágeno em sua forma nativa, avaliando as características físico-químicas de ambos e prospectando o potencial antioxidante do hidrolisado.

Além de novas fontes de proteínas, a demanda por antioxidantes de fontes naturais também cresce (CAROCHO et al., 2018), a fim de substituir os antioxidantes produzidos de forma sintética, largamente utilizados pelo mercado. A proposta foi gerar conhecimento que possibilitasse prospectar potencialidades desta espécie e vislumbrar

sua utilização como matéria prima para a obtenção de colágeno, bem como explorar a potencial atividade antioxidante que essas proteínas pudessem apresentar.

OBJETIVOS

Objetivo geral

Desenvolver método de extração de colágeno e de produção de um hidrolisado proteico da medusa *Rhacostoma atlanticum*, advindas no *bycatch* da pesca, e avaliar a atividade antioxidante do mesmo.

Objetivos específicos

- Desenvolver um protocolo de produção de hidrolisado proteico da medusa *R. atlanticum*;
- Obter o colágeno de forma íntegra previamente à hidrólise;
- Caracterizar bioquimicamente o hidrolisado, através da mensuração de proteínas solúveis, SDS-PAGE e FTIR;
- Verificar a atividade antioxidante do hidrolisado.

CAPÍTULO I

COLÁGENO DE ÁGUAS-VIVAS: DO *BYCATCH* À ATIVIDADE ANTIOXIDANTE

Manuscrito à ser submetido como artigo de revisão na Revista
BRAZILIAN JOURNAL OF AQUATIC SCIENCE AND TECHNOLOGY – BJASt

RESUMO

O colágeno é um grupo de proteínas amplamente estudado e de vasta aplicação, incluindo indústrias farmacêuticas, biomédicas, cosméticas, de couro e filmes, devido às suas características como biocompatibilidade, bioatividade e fraca antigenicidade. Embora as fontes de colágeno sejam abundantes, principalmente quando se utiliza os resíduos da agroindústria, o surto de doenças entre animais terrestres e questões religiosas e de higiene têm ameaçado a sua utilização em nosso cotidiano. O aproveitamento de matérias primas descartadas ou dos resíduos da indústria agropecuária (bovinos e suínos) surge como alternativa para amenizar o problema. Na busca por fontes alternativas, as de origem marinha ainda inexploradas, como águas-vivas e invertebrados marinhos provenientes da pesca não intencional se tornaram potenciais fontes de proteínas colagenosas. O presente artigo traz um breve panorama da pesca, principalmente a captura de organismos de forma não intencional, a descrição das estruturas do colágeno e suas classificações, o processo de extração realizado industrialmente e os estudos sobre a utilização do colágeno de águas-vivas e seus hidrolisados nas áreas da medicina e da nutrição humana. A partir deste panorama, é possível observar a grande lacuna que é encontrada hoje no aproveitamento de organismos capturados não intencionalmente na indústria de pesca e como essas alternativas podem alterar este cenário.

Palavras-chave: proteínas, águas-vivas, hidrólise, atividades biológicas.

ABSTRACT

Collagen is a widely studied and widely applied group of proteins, including pharmaceutical, biomedical, cosmetic, leather and film industries, due to their characteristics such as biocompatibility, bioactivity and poor antigenicity. Although sources of collagen are plentiful, especially when using waste from the agroindustry, the outbreak of diseases among land animals and religious and hygiene issues have threatened its use in our daily lives. The use of discarded raw materials or residues from the agricultural industry (cattle and pigs) is an alternative to mitigate the problem. In the search for alternative sources, marine sources still unexplored, such as jellyfish and marine invertebrates from unintentional fishing have become potential sources of collagenous proteins. This article provides a brief overview of fisheries, particularly the

unintentional capture of organisms, the description of collagen structures and their classifications, the industrialized extraction process and studies on the use of jellyfish collagen and its hydrolysates in the areas of medicine and human nutrition. From this panorama, it is possible to observe the great gap that is found today in the use of organisms captured unintentionally in the fishing industry and how these alternatives can change this scenario.

Key words: proteins, jellyfish, hydrolysis, biology activities.

CONTEÚDO

1. INTRODUÇÃO.....**Erro! Indicador não definido.**
 - 1.1 Pesca e bycatch.....**Erro! Indicador não definido.**
 - 1.2 Colágeno**Erro! Indicador não definido.**
 - 1.3 Produção industrial de colágeno.....**Erro! Indicador não definido.**
 - 1.4 Colágeno de medusas**Erro! Indicador não definido.**
 - 1.5 Atividades biológicas do colágeno de origem marinha e seus hidrolisados.....**Erro! Indicador não definido.**
2. CONCLUSÃO.....**Erro! Indicador não definido.**
3. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**Erro! Indicador não definido.**

1. INTRODUÇÃO

O colágeno é um grupo de proteínas encontrada nos tecidos animais, com diferentes características estruturais, as quais fazem com que desempenhem diversas funções no organismo, como manter as células dos tecidos unidas e fortalecê-las, responsável também pela cicatrização ou regeneração em caso de corte ou cirurgia; auxiliar na hidratação e na repressão de processo do envelhecimento (GONÇALVES et al., 2015; SCHIMIDT et al., 2016, GHAZANFARI et al., 2016).

Essas características conferem a esta proteína, ampla utilização na indústria, principalmente alimentícia, onde é utilizada como emulsificante e na produção de gelatinas (SILVA 2010). Na área médica, estudos vêm demonstrando a potencial

utilização na produção de gases cirúrgicas (CHEN et al., 2016) e como biomateriais para a sustentação de tecidos (HOYER et al., 2013, KRISHNAN & PERUMAL, 2013). No entanto, grande parte do colágeno utilizado atualmente é proveniente de tecidos bovinos ou suínos (GÓMEZ-GUILLÉN et al., 2011). A utilização dessa fonte de matéria prima tem sido questionada, tanto por questões religiosas, como no caso do islamismo, que proíbe o consumo de carne suína, quanto por causa de doenças que podem ser transmitidas por mamíferos, como a encefalopatia espongiforme bovina (EEB), encefalopatia espongiforme transmissível (EET) e febre aftosa (KITTIPIHATTANABAWON et al., 2010; SCHIMIDT et al., 2016; ZHANG et al., 2016).

Mais recentemente, o estudo e a utilização de hidrolisados de colágeno cresceu, uma vez que propriedades bioativas foram observadas, atuando contra a fadiga, hipertensão, radicais livres e melhorando atividade imunoestimulatória (DING et al., 2011; LI et al., 2014; SUGARARA et al., 2014; PUTRA, 2015; ZHANG et al., 2016). Além disso, o processo de hidrólise do colágeno contribui para que os aminoácidos que os compõem sejam absorvidos rapidamente pelo organismo, facilitando a adição destes hidrolisados em alimentos do dia-a-dia, agregando valor aos mesmos (SCHIMIDT et al., 2016).

Neste contexto, a busca por novas opções de fontes de colágeno torna-se necessária e a prospecção destas biomoléculas em organismos marinhos vêm mostrando resultados pertinentes na utilização para fins farmacológicos (FELICIAN et al., 2018). A utilização de organismos pertencentes ao *bycatch* da pesca extrativista surge como uma possibilidade, como forma de minimizar os impactos negativos destas capturas para o ecossistema aquático (HALL et al., 2000; BHAGWAT & DANDGE, 2018). As águas-vivas, capturadas de forma não intencional e sem valor comercial, fazem parte do *bycatch* e têm chamado a atenção pelo aumento dos registros dos seus *blooms* em diversos países (MILLS, 2001; PURCELL et al., 2007; CONDON et al., 2012).

1.1 Pesca e *bycatch*

Em 2014 a produção mundial de pescado chegou a 93,4 milhões de toneladas, dos quais 81,5 milhões de toneladas oriundas de águas marinhas e 11,9 milhões de toneladas de águas continentais (FAO, 2016). Ainda segundo a mesma fonte, a fração da produção mundial de peixe utilizada para consumo humano direto aumentou

consideravelmente nas últimas décadas: de 67% nos anos 60 para 87% (mais de 146 milhões de toneladas) em 2014. A atividade pesqueira movimenta cerca de US\$ 600 bilhões todos os anos, o que torna os negócios com pescado sete vezes maior que os de carne bovina e nove vezes maior que os de carne de frango em nível mundial (MAPA, 2015).

O aumento do consumo de pescado tem sido estimulado pela crescente demanda por alimentos mais saudáveis, pelo aumento de renda e pela intensificação da urbanização (CLARK et al., 2018). O consumo mundial de pescado *per capita* aumentou, de 1 kg de pescado em 1800, para 19,7 kg de pescado em 2013, mostrando como esses produtos conquistaram mais apreciadores (FAO, 2016). Apesar do crescimento observado, no entanto, há ainda uma grande diferença entre o consumo *per capita* nos países emergentes em comparação aos mais industrializadas (ASCHE et al., 2015; BELTON et al., 2018). Segundo a FAO (2016), o consumo anual *per capita* de peixe aumentou nas regiões em desenvolvimento (de 5,2 kg em 1961 para 18,8 kg em 2013), enquanto em países de baixa renda e com déficit alimentar (PBRDA) o aumento foi menor (de 3,5 kg para 7,6 kg). Já em regiões mais desenvolvidas o consumo chegou a 26,8 kg.

Por outro lado, diversos estudos demonstram impactos negativos no setor pesqueiro, como a sobre-exploração de espécies de valor comercial (HALL et al., 2000; LOPES et al., 2018), o ecossistema marinho e seus estoques populacionais afetados por mudanças climáticas (GRAFTON, 2010; SUMAILA et al., 2011; DING et al. 2017) e o aumento de resíduos gerados pelas indústrias, nem sempre aproveitados (AMORIM et al., 2016; CISNEROS-MONTEMAYOR et al., 2018). Outro agravante da pesca extrativista, tanto no mundo como no Brasil, é a gestão do descarte da fauna acompanhante (PERES & WAHRLICH, 2005; CASTELLO, 2008; MEDEIROS, 2017). A pesca não seletiva leva à captura de diversas espécies que não tem valor econômico. Estima-se que, no mundo, cerca de 7,3 milhões de toneladas de pescado sejam descartados anualmente (FAO, 2014). Esta fauna é composta por organismos de baixo ou nenhum valor comercial e espécies-alvo em fase juvenil ou fora dos padrões de tamanho exigidos pelo mercado (POTT & WIEDENFELD, 2017; CISNEROS-MONTEMAYOR et al., 2018).

McCaughran (1992) definiu as capturas acessórias, como a porção das capturas devolvidas ao mar, resultado de considerações econômicas ou legais, além das capturas

de espécies não-alvo. Esta definição não diferencia, dentre os organismos não alvo, quais eram devolvidos ao mar já mortos ou feridos. Por isso, Hall e colaboradores (2000) propuseram uma nova definição do termo *bycatch*, levando em consideração a captura total e a dividindo em três partes: i) a parte da captura total que contém as espécies alvos e não alvos, porém com valor econômico, denominada *retida*; ii) organismos sem valor comercial devolvidos mortos ou com ferimento decorrente de morte, denominados de *bycatch*; iii) a parte devolvida viva, com possibilidade de reabilitação, denominada *release*.

Segundo Lobo et al., (2010), as redes de arrasto de camarão, realizados principalmente em águas tropicais, representam cerca de um terço das capturas incidentais globais. Capturam 400 espécies não-alvo, com relação de captura de até 10 kg de *bycatch* para cada kg de camarão (KELLEHER, 2005; LOBO et al., 2010). Para o Brasil, o descarte da pesca de arrasto de camarão nas regiões Sul e Sudeste giram entre 22 e 33%, perdendo apenas para a Argentina, onde as taxas de devolução chegam a 50% (KELLEHER, 2005).

Dentre esta fauna encontram-se as formas macromedusoides de cnidários, popularmente chamadas de águas-vivas. Estudos relatam a ocorrência destes organismos em diversas artes de pesca, tanto na frota artesanal como na industrial (NOGUEIRA JR. & HADDAD, 2006; NAGATA et al., 2009; SCHROEDER et al., 2014). Neste contexto, esses resíduos têm sido investigados como fonte de biomoléculas com atividades biológicas relevantes para a saúde humana, como antioxidante, anti-hipertensiva, imunoestimulatória e antifadiga (DING et al., 2011; LI et al., 2014; SUGARARA et al., 2014; PUTRA, 2015).

Grande parte do *bycatch* é constituído de espécies que possuem, em sua constituição, quantidades consideráveis de proteínas colagenosas, como é o caso dos moluscos (NAM et al., 2008; PARK et al., 2016), equinodermos (SIDDIQUI et al., 2013; ZHONG et al., 2015) e cnidários (DING et al., 2011; ADDAD et al., 2011; ZHANG et al., 2014; LI et al., 2014; PUTRA et al., 2015). Em especial, os cnidários chamam a atenção, por causar acidentes graves com pescadores, turistas e banhistas (RESGALLA JR., et al., 2005; HADDAD et al., 2010; TOMLINSON et al., 2018), e também devido ao aumento de suas densidades nos últimos anos em diferentes países (PURCELL et al., 2007). A não utilização dessa biomassa capturada de forma acidental

faz com que o esforço de pesca aumente, na tentativa de se atingir uma quantidade viável de biomassa de pescado para desembarque.

1.2 Colágeno

O colágeno é um grupo de proteínas estruturais e o termo é utilizado para denominar um conjunto de cerca de 28 tipos de isoformas de proteínas encontradas nos tecidos conjuntivos animais, como: ossos, tendões, dentes, pele, veias, músculos, córnea e demais órgãos (RICARD-BLUM, 2010; SILVA & PENNA, 2012; FERREIRA et al., 2012; PRESTES et al., 2013; SIBILLA et al., 2015; ZHANG et al., 2016). Também são encontrados no tecido intersticial de praticamente todos os órgãos do parênquima, onde contribuem para a estabilidade dos tecidos e órgãos e mantêm sua integridade estrutural (GELSE et al., 2003; GÓMEZ-GUILLEN et al., 2011). É uma das principais proteínas fibrosas insolúveis encontradas na matriz extracelular da pele, juntamente com elastina e ácido hialurônico (SIBILLA et al., 2015). Segundo Prestes, (2012) o colágeno representa cerca de 30% de toda a matéria orgânica e 60% das proteínas totais do corpo animal.

Em sua revisão sobre colágeno, Miller & Gay (1982) salientam que suas formas e funções podem ser diversas e estão presentes nas fibras estriadas macias em tendões e ligamentos, nas fibrilas finas observadas em porções de cartilagens hialinas, nas redes reticulares de vários tecidos conjuntivos e nos agregados aparentemente amorfos que ocorrem nas membranas basais. Além disso, os elementos de suporte do colágeno estão intimamente associados a uma variedade de materiais da matriz extracelular, como depósitos amorfos ou cristalinos de sais de fosfato de cálcio, agregados de proteoglicanos e glicoproteínas macromoleculares específicas, como a fibronectina (GHAZANFARI et al., 2016; SALDIN et al., 2016).

O colágeno é produzido principalmente por fibroblastos nos tecidos conjuntivos, mas também por células epiteliais, capazes de produzir certos tipos de colágeno (SIBILLA et al., 2015; GHAZANFARI et al., 2016). Conforme os mesmos autores, os fibroblastos são células do tecido conjuntivo na derme que são responsáveis pela produção e organização da matriz de colágeno. Os diferentes tipos de colágeno e as estruturas que eles formam têm o propósito de ajudar os tecidos a resistir às forças de tensão (SILVA & PENNA, 2012). De acordo com a literatura existente, com base na sua estrutura e organização supramolecular, estas proteínas podem ser classificadas em grupos menores, de acordo com a sua distribuição nos tecidos, sendo: colágeno

formador de fibrilas, colágeno associado a fibrilas com tripla hélice interrompida (FACIT), colágeno formador de rede, fibrilas de ancoragem, colágeno transmembrana, colágeno de membrana basal e outros com funções únicas (GELSE et al., 2003, SCHIMIDT et al., 2016) (Tabela 1).

Tabela 1- Principais tipos de colágeno e sua distribuição tecidual.

<i>Colágeno formadores de fibrilas</i>		
I	[$\alpha 1(I)$] ₂ $\alpha 2(I)$	Pele, tendão, osso, dentina.
II	[$\alpha 1(II)$] ₃	Cartilagem, corpo vítreo, núcleo pulposo.
III	[$\alpha 1(III)$] ₃	Pele, parede dos vasos, fibras reticulares da maioria dos tecidos.
V	$\alpha 1(V)$, $\alpha 2(V)$, $\alpha 3(V)$	Pulmão, córnea, ossos, tecidos fetais; juntamente com o colágeno tipo I.
XI	$\alpha 1(XI)$ 2(XI) $\alpha 3(XI)$	Cartilagem, corpo vítreo.
<i>Colágeno da membrana basal</i>		
IV	[$\alpha 1(IV)$] ₂ $\alpha 4(IV)$; $\alpha 1-\alpha 6$	Membranas basais.
<i>Colágeno microfibrilar</i>		
VI	$\alpha 1(VI)$, $\alpha 2(VI)$, $\alpha 3(VI)$	Derme, cartilagem, placenta, pulmões, da parede do vaso, disco intervertebral.
<i>Fibrilas de ancoragem</i>		
VII	[$\alpha 1(VII)$] ₃	Pele, junções epidérmicas, cérvix.
<i>Colágenos formadores de rede hexagonal</i>		
VIII	[$\alpha 1(VIII)$] ₂ $\alpha 2(VIII)$	Células endoteliais.
X	[$\alpha 3(X)$] ₃	Cartilagem hipertrófica.
<i>Colágenos FACIT</i>		
IX	$\alpha 1(IX)$ $\alpha 2(IX)$ $\alpha 3(IX)$	Cartilagem, humor vítreo, córnea.
XII	[$\alpha 1(XII)$] ₃	Pericôndrio, ligamentos, tendões.
XIV	[$\alpha 1(XIV)$] ₃	Derme, tendão, da parede do vaso, placenta, pulmões, fígado.
XIX	[$\alpha 1(XIX)$] ₃	Rabdomiossarcoma humano.
XX	[$\alpha 1(XX)$] ₃	Epitélio da córnea, pele embrionária, cartilagem esternal, tendão.
XXI	[$\alpha 1(XXI)$] ₃	Parede de vasos sanguíneos.
<i>Colágenos transmembranares</i>		
XIII	[$\alpha 1(XIII)$] ₃	Epiderme, endomísio, intestino, condrócitos, pulmões, fígado.
XVII	[$\alpha 1(XVII)$] ₃	Junções derme-epidérmicas.
<i>Multiplexin</i>		
XV	[$\alpha 1(XV)$] ₃	Fibroblastos, células musculares lisas, rim, pâncreas.
XVI	[$\alpha 1(XVI)$] ₃	Fibroblastos, queratinócitos.
XVIII	[$\alpha 1(XVIII)$] ₃	Pulmões, fígado, timo, músculo, intestino, pele.

Fonte: Oliveira et al., 2017

Cada cadeia peptídica é formada pela repetição de três aminoácidos (Gly-X-Y), sendo o aminoácido glicina (Gly) um pré-requisito importante para a conformação da tripla hélice (FERREIRA et al., 2012; SCHIMIDT et al., 2016; OLIVEIRA et al., 2017). A glicina está presente em todos os tipos de colágeno já descritos e esta

característica se deve ao átomo de hidrogênio como grupamento R, o qual se posiciona em direção ao centro da espiral da hélice (OLIVEIRA et al., 2017; AOUACHERIA et al., 2017). A glicina é o único aminoácido cuja cadeia é levemente torcida em relação à outra, o que permite uma ponte de hidrogênio entre a amida polipeptídica do hidrogênio de um resíduo de glicina com o carbono do resíduo X adjacente, de outra cadeia (PRESTES, 2013). O resíduo X na grande maioria das vezes é prolina ou hidroxiprolina e o Y pode ser qualquer um dos outros 20 aminoácidos naturais (GÓMEZ-GUILLEN et al., 2011; SILVA & PENNA, 2012) (Figura 1).

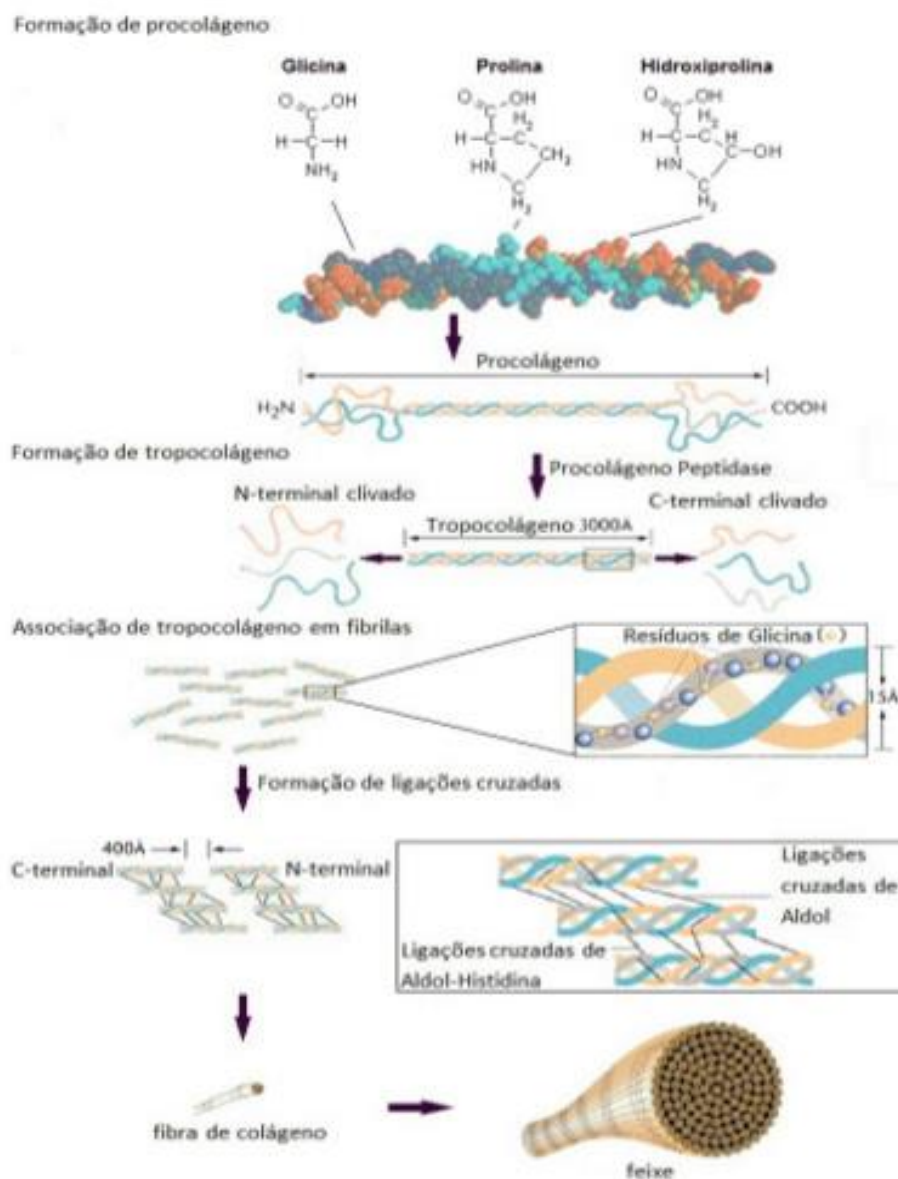


Figura 1 Processo de formação, organização e estrutura do colágeno. Fonte: Damodaran et al., 2010.

Os diferentes tipos de colágeno se diferenciam principalmente pelo número de aminoácidos que compõem as cadeias alfa (SIBILLA et al., 2015). A repetição dessa sequência de aminoácidos pode ocorrer 334 vezes (PRESTES, 2013) e a estabilidade desta cadeia individual, se deve à ligações covalentes e pontes de hidrogênio, as quais lhe conferem conformação chamada alfa (α) hélice (GÓMEZ-GUILLEN et al., 2011). A tripla hélice pode ser flexível por causa da presença de imperfeições nos três resíduos de aminoácidos que as compõe (Gly-X-Y) (RICARD-BLUM, 2012; OLIVEIRA et al., 2017). Conforme os mesmos autores, interrupções não helicoidais na tripla hélice estão associadas ao nível molecular com regiões locais de considerável plasticidade, flexibilidade e reconhecimento molecular. A grande diversidade nesta família se deve à existência de várias isoformas moleculares para o mesmo tipo de colágeno (GELSE et al., 2003, SCHIMIDT et al., 2016).

Os colágenos são formados pela união de cadeias polipeptídicas que podem ser homotriméricas (três cadeias individuais idênticas, como no colágeno tipo II) ou heterotriméricas (três cadeias individuais diferentes, como no colágeno tipo IX) (RICARD-BLUM, 2010). O colágeno tipo I, por exemplo, é uma cadeia tripla heterotrimérica, formada por duas cadeias $\alpha 1(I)$ e uma cadeia $\alpha 2(I)$, as quais estão sob a forma helicoidal em sua porção central (SCHIMIDT et al., 2016). Já o colágeno tipo III é um homotrímero formado por três cadeias α (III) (GELSE et al., 2003). Os colágenos tipos V e XI são heterotrímeros formados por três cadeias alfa diferentes ($\alpha 1$, $\alpha 2$ e $\alpha 3$), sendo a cadeia $\alpha 3$ do colágeno tipo XI codificada pelo mesmo gene da cadeia $\alpha 1$ do colágeno tipo II (GELSE et al., 2003). Os autores ainda destacam que apenas a extensão da glicosilação e da hidroxilação diferem entre si. Também ocorrem isoformas híbridas, constituídas por cadeias pertencentes a dois tipos diferentes de colágeno, como por exemplo os colágenos tipo V/XI, onde a cadeia $\alpha(XI)$ forma moléculas de colágeno híbrido tipo V/XI por montagem com a cadeia $\alpha 1(V)$ (MAYNE et al., 1993). Outro exemplo é na cartilagem, onde ocorre um aumento em $\alpha 1$ (V) e uma diminuição em $\alpha 2(XI)$ durante a maturação pós-natal (WU et al. 2009; RICARD-BLUM, 2010). As cadeias de colágeno variam em tamanho de 662 até 3152 aminoácidos para as cadeias humanas $\alpha 1(X)$ e $\alpha 3$ (VI), respectivamente (RICARD-BLUM, 2010; GORDON & HAHN, 2010).

O colágeno tipo I é o mais abundante, representando cerca de 90% de todo o colágeno encontrado no corpo humano (PRESTES, 2013; PRESTES et al., 2013; SIBILLA et al., 2013; RICARD-BLUM, 2010, GÓMEZ-GUILLEN et al., 2011; FAUZI et al., 2016; OLIVEIRA et al., 2017). Por suas características mais rudimentares, forma mais de 90% da massa orgânica óssea e é o colágeno de tendões, ligamentos, córnea e muitos tecidos conjuntivos intersticiais (SIBILLA et al., 2015), sendo o mais estudado e utilizado na engenharia e produção de biomateriais (FAUZI et al., 2016). É também o principal componente da pele humana (80%) juntamente com colágeno tipo III (15%) (GELSE et al., 2003; SIBILLA et al., 2013; FAUZI et al., 2016; OLIVEIRA et al., 2017) e outros tipos de colágeno, com menor representatividade, como o colágeno do tipo VII (0,001%) (RICARD-BLUM, 2012).

Os colágenos do tipo I, II, III, V e IX, são considerados formadores de fibrilas, pois tem como característica comum a formação de agregados supramoleculares altamente orientados (GELSE et al., 2003). Ainda de acordo com os mesmos autores, os tipos de colágeno se caracterizam pela considerável complexidade e diversidade em sua estrutura, como as fibrilas de colágeno dos tipos I e V, que contribuem para a estruturação dos ossos e dos colágenos tipos II e XI, que contribuem, predominantemente, para matriz das cartilagens articulares, mantendo a estabilidade e integridade desses tecidos. O colágeno tipo III é altamente dependente da idade, estando presente em até 50% na pele jovem e reduzido para 5-10% com o passar do tempo (SCHIMIDT et al., 2016).

Já os colágenos dos tipos IX, XII, XIV, XVI, XIX e XX pertencem ao grupo chamado de colágenos associados a fibrilas com tripla hélice interrompida (RICARD-BLUM, 2012). Esses colágenos apresentam interrupções que se caracterizam por pequenos domínios não helicoidais e suas moléculas estão associadas a fibrilas. Esses tipos de colágeno estão associados principalmente aos demais tipos de colágeno, contribuindo na formação de diversos tecidos, através da formação de redes de fibrilas (GELSE et al., 2003).

O colágeno tipo VI está presente principalmente na ultraestrutura de filamentos finos, microfibrilas e segmentos de bandas cruzadas (GELSE et al., 2013). Segundo os mesmos autores, diversos colágenos (IV, VI, XVIII e XXV) são depositados nos cérebros de pacientes com doença de Alzheimer, onde se ligam ao peptídeo β amiloide. Isto porque o colágeno do tipo VI parece proteger os neurônios contra a toxicidade deste

peptídeo, a qual presume-se ser uma das causadoras da doença de Alzheimer (CHENG et al., 2009). Já o colágeno do tipo IV é o principal componente de formação das membranas basais e um dos colágenos com menor peso molecular, com aproximadamente 180 kDa (CAÑAS et al., 2018).

1.3 Produção industrial de colágeno

A busca por fontes alternativas de colágeno cresce constantemente, pois as já existentes e comumente utilizadas não conseguem suprir o mercado de forma adequada (FELICIAN et al., 2018). Os motivos que restringem o uso destas matérias-primas convencionais estão relacionados à biocompatibilidade, por doenças que podem ser transmitidas ou por motivos religiosos (CHEN et al., 2016). Por isso, na tentativa de utilizar novas fontes de proteínas, diversos estudos foram desenvolvidos no sentido de comparar colágenos oriundos de matérias-primas de distintos ambientes de origem: a) terrestre, como bovinos e suínos (FAUZI et al., 2016; ZHOU et al., 2016) e b) aquáticos, como peixes e medusas (DUAN et al., 2009; ADDAD et al., 2011; ZHANG et al., 2014; ZHANG et al., 2016; LI et al., 2017; FELICIAN et al., 2018; DERKUS et al., 2018). Muito esforço tem sido feito também na prospecção de matérias-primas não aproveitadas pelas indústrias ou de seus próprios resíduos (GHALY et al., 2013; BHAGWAT & DANDGE, 2018).

O colágeno é encontrado em tecidos de animais e já é utilizado pela indústria, sendo extraído de resíduos de bovinos, suínos, aves e, mais recentemente, peixes (SCHIMIDT et al., 2016; WANG et al., 2017). Pela abundância e grande quantidade em vários tecidos, é do colágeno tipo I, II e III que se deriva a maioria dos colágenos encontrados comercialmente (BHAGWAT & DANDGE, 2018). É a partir do colágeno tipo I que são geradas as gelatinas e os hidrolisados de colágeno (SILVA & PENA, 2012; PRESTES, 2013). No Brasil, grande parte do colágeno é oriundo da produção industrial da carne, devida a elevada produção de carne para exportação (SILVA & PENNA, 2012). Enquanto isso, empresas internacionais já se dedicam a produção de colágeno em grande escala, exportando para diversos países, inclusive para o Brasil, para diversas utilizações, dentre elas a utilização do colágeno para a produção de meios de cultura para microorganismos.

As gelatinas são derivadas da hidrólise parcial do colágeno animal, contido em ossos e peles, principalmente de suínos e bovinos (GÓMEZ-GUILLÉN & MONTERO, 2001). São proteínas desnaturadas, derivadas do colágeno por termo-hidrólise e tem a

propriedade reológica de termo-reversibilidade com a transformação para gel. É um dos mais importantes biopolímeros, com larga aplicação na indústria alimentícia, farmacêutica, cosmética e fotográfica, sendo utilizada na produção de colas, cápsulas, geléias, doces, cremes, vinhos (clarificação), gelatina para sobremesa, entre outros (BHAGWAT & DANDGE, 2018). Seu uso tem se expandido para novas aplicações, sendo utilizada, também, como alimento funcional (CHO et al., 2004).

Existem muitas técnicas potenciais para a extração da proteína a partir de tecido animal. Estas incluem a utilização de água e solventes orgânicos, processos convencionais de cozimento, aplicação de altas pressões, secagem e mais recentemente ultrassom (MARTINS et al., 2009; SCHIMIDT et al., 2016). Comercialmente, a gelatina é obtida a partir do pré-tratamento ácido ou alcalino (os quais se diferenciam pelo método de separação das ligações do colágeno) do tecido conjuntivo de mamíferos (principalmente suínos e bovinos), que corresponde à etapa de extração. As gelatinas podem ser classificadas de acordo com o ponto isoelétrico da proteína ou com o tipo de processo a que é submetida a matéria prima (PRESTES, 2012). As gelatinas são classificadas como tipo A (ponto isoelétrico ~ 7-9, processo ácido) e tipo B (ponto isoelétrico ~4-5, processo alcalino), além do colágeno hidrolisado, obtido por hidrólise química e enzimática sob condições controladas (GÓMEZ-GUILLEN et al., 2011; PRESTES, 2013; LIN et al., 2017).

Após a etapa de tratamento ácido ou alcalino, a gelatina extraída na forma de solução diluída, passa por um processo de purificação, a qual corresponde às etapas de filtração, desodorização, concentração, evaporação e resfriamento (ARNESEN & GILDBERG, 2002). Segundo Gómez-Guillén et al. (2011), a maioria das pesquisas direcionadas à extração de gelatinas na indústria estão voltados para pele de suíno (cerca de 46%), couro bovino (29,4%) e ossos de bovinos e suínos (23,1%). Conforme os mesmos autores, as gelatinas providas de peixes somaram 1,5% do total da produção de gelatinas, no ano de 2007. Já o colágeno hidrolisado consiste em pequenos peptídeos com baixo peso molecular (0,3 – 8 kDa), produzidos a partir de colágeno nativo e, devido ao seu baixo peso molecular, é facilmente digerível, absorvido e distribuído no corpo humano (SIBILLA et al., 2013). Para realizar a hidrólise, métodos químicos e biológicos são utilizados; a hidrólise química é mais comumente utilizada na prática industrial, porém os processos biológicos que utilizam enzimas são mais

promissores quando se deseja produtos com alta funcionalidade e valor nutritivo (MARTINS et al., 2009).

A extração e a purificação por meio de processos químicos tendem a levar alguns dias até se alcançar o produto final. Schimidt et al. (2016) em revisão sobre o assunto, elucidam algumas técnicas utilizadas para a extração e hidrólise do colágeno. O processo se inicia com o mergulho da matéria prima em soluções ácidas, como o ácido acético ou clorídrico, ou básicas, geralmente o hidróxido de sódio, sob agitação a 4-10 °C. Devido à natureza do colágeno reticulado encontrado no tecido conjuntivo dos animais, sua dissolução é lenta, mesmo em altas temperaturas (SCHIMIDT et al., 2016). Por isso a utilização de um pré-tratamento químico suave é importante para hidrolisar as ligações químicas intercadeias (que ligam as cadeias alfa) que formam as fibras de colágeno, antes da extração do mesmo. Essa etapa também auxilia na retirada de proteínas não colagenosas que estão presentes na matéria prima (CHENG et al., 2016), além de remover cálcio, gorduras e o máximo de impurezas sem que haja desnaturação proteica do colágeno (OLIVEIRA et al., 2017). O tratamento pode variar dependendo das características do material utilizado. O pré-tratamento ácido pode ser utilizado para materiais mais frágeis, com menos fibras de colágeno entrelaçadas, como peles de peixes e suínos, e o tratamento com hidróxido de sódio é empregado para materiais mais espessos, podendo durar dias, como é o caso do colágeno extraído de ossos (SCHIMIDT et al., 2016). O tratamento alcalino, para a produção das gelatinas tipo B, é o mais utilizado na indústria, por ser um tratamento mais drástico, sendo capaz hidrolisar as proteínas até aminoácidos, resultando em menor faixa de massa molar (PRESTES, 2012). Após este processo, as fibras de colágeno são precipitadas pela adição de sais ao meio, como o cloreto de sódio sólido ou soluções salinas, ou ainda outros sais, como o Tris-HCl (cloridrato de tris (hidroximetil) aminometano), fosfatos ou citratos (SCHIMIDT et al., 2016).

Após o processo de extração e precipitação do colágeno, é realizada a adição de enzimas proteolíticas que clivam as regiões terminais das fibras de colágeno, de acordo com a composição de aminoácidos que formam essas cadeias, possibilitando que as fibras não percam sua conformação de hélice, para se obter as cadeias colágeno individuais (MARTINS et al., 2009; SIBILLA et al., 2013; SCHIMIDT et al., 2016). As enzimas mais utilizadas nesse processo são a pepsina, papaína, tripsina e misturas de enzimas, como a Protamex (ZHUANG et al., 2009; BARZIDEH et al., 2014) que, até o

momento, têm se mostrado eficientes na hidrólise das cadeias peptídicas do colágeno. Depois, ocorre a desativação da enzima por meio de temperatura, ajuste de pH e diálise. Métodos de hidrólise por temperatura também podem ser empregados após a utilização das enzimas, a fim de se obter um hidrolisado com menores pesos moleculares. Consequentemente o processo segue para filtração ou centrifugação, esterilização e secagem, para a obtenção de um produto em pó (PRESTES, 2012).

1.4 Colágeno de medusas

Devido a problemas associados com o envenenamento, as medusas, principalmente as de grande porte, são evitadas por banhistas e mergulhadores (HADDAD et al., 2001, 2002 e 2010; MORANDINI et al., 2005; RESGALLA JR et al., 2005; NOGUEIRA JR., 2006). Os pescadores também a evitam, devido a sua interferência na pesca (NAGATA et al., 2009). Por outro lado, também é reconhecida a grande contribuição ecológica desses organismos, tanto para as cadeias tróficas quanto para o ciclo do carbono nos oceanos (GRAHAM et al., 2014).

Outro fenômeno pelo qual as águas-vivas chamam atenção é quando ocorrem em altas densidades, conhecidos por *blooms* (PURCELL et al., 2007). As explicações para estes *blooms* têm sido correlacionadas com as condições favoráveis do meio marinho favorecendo um crescimento populacional acima do normal. Há alguns anos esses fenômenos ocorrem em maior frequência e podem estar associadas ao aquecimento global, as alterações do ambiente marinho pela poluição e a sobrepesca de seus principais predadores e competidores (MILLS, 2001; PURCELL et al., 2007; CONDON et al., 2012). Simultaneamente, a literatura científica sobre matérias-primas alternativas e novas funcionalidades do colágeno cresceu nos últimos 15 anos (FELICIAN et al., 2018; BHAGWAT & DANDGE, 2018; KHONG et al., 2017; CANÃS et al., 2018). Isto devido ao crescente interesse na valorização econômica dos subprodutos industriais (a partir da indústria de peixe), à gestão de resíduos industriais, pela procura de condições de processamento inovadoras e de potenciais novas aplicações (GOMÉZ-GUILLÉN et al., 2011). Dentre as fontes alternativas estudadas, está o colágeno de medusas, que segundo Khong et al. (2017) são uma fonte promissora de colágeno, já que não tem limitações no uso de quaisquer religiões e não há relatos da ligação das proteínas desta origem com doenças infecciosas fatais.

Países asiáticos tem um longo histórico com o processamento destes organismos como alimento humano. A China foi o primeiro país a introduzir medusas na alimentação e os registros mais antigos datam da dinastia Tsin (OMORI & NAKANO, 2001; HSIEH et al., 2001). A partir da década de 1970 a demanda cresceu também em outros países, como o Japão, que passaram a comercializar o produto. Hoje, o Japão é o país que mais consome medusas salgadas (OMORI & NAKANO, 2001) e, para suprir a demanda, importam de outros países como Austrália, México e Estados Unidos, que desenvolveram a técnica oriental de salga e exportam para diversos países da Ásia (HSIEH et al., 2001).

Dentre as espécies de águas-vivas intensivamente exploradas comercialmente para consumo, a grande maioria é pertencente a classe Scyphozoa, ordem Rhizostoma. Espécies como *Rhopilema hispidum*, *Rhopilema esculentum* e *Nemopilema nomurai* estão entre as mais utilizadas (MORISHIGE et al., 2011; KAWAHARA et al., 2006). Essa preferência está associada ao fato desses animais serem de grande porte e possuírem corpos mais rígidos, resultando em maior rendimento após a salga, comparados com outras espécies (MORISHIGE et al., 2011) e por suas toxinas terem baixa capacidade de envenenamento (KAWAHARA et al., 2006).

Proteínas colagenosas de medusas já foram extraídas, isoladas e caracterizadas nas espécies *Stomolophus nomurai* por Miura e Kimura (1985), *Rhopilema asamushi* por Nagai et al. (2000) e *Rhizostoma pulmo* por Addad et al. (2011). O colágeno extraído de águas-vivas tem em sua estrutura tipos de colágeno que são encontrados também em vertebrados, podendo ser utilizado em cosméticos, na alimentação e com fins terapêuticos (HSIEH & RUDLOE, 1994; XU, 2013). Chen e colaboradores (2016) investigaram a utilização de esponjas de colágeno de medusas da espécie *Rhopilema esculentum* no controle da homeostase e na absorção do volume sanguíneo em procedimentos cirúrgicos realizados em ratos. Quando comparada com gaze cirúrgica disponível no mercado, a utilização das esponjas de colágeno apresentou redução significativa no tempo de sangramento em ratos, ocorrendo estancamento do sangue dentro de 5 minutos depois do tratamento (CHEN et al., 2016).

Segundo Hesieh e colaboradores (2001) os benefícios medicinais que estes alimentos proporcionam já foram reportados em revistas não científicas em mandarim. A cultura chinesa credita às águas-vivas a cura eficaz para artrite, hipertensão, dor nas costas e úlceras, enquanto amaciam a pele e melhoram a digestão. No entanto, nenhuma

pesquisa científica foi realizada para documentar a eficácia medicinal das águas-vivas. A hipótese é que o colágeno é o ingrediente que contribui para os efeitos benéficos para a saúde porque é o material de construção essencial do tecido muscular, da cartilagem e do osso, e tem uma grande promessa medicinal (HSIEH & RUDLOE, 1994). Hoyer et al. (2013) e Gupta et al. (2014) sugerem a utilização do colágeno da água viva *Rhopilema esculentum* em engenharia de materiais com aplicação na estruturação dos tecidos da cartilagem e para suportes porosos para a diferenciação condrogênica das células-tronco mesenquimais humanas, uma vez que o colágeno encontrado é muito similar ao colágeno tipo II encontrado em mamíferos. Esse colágeno, que possui aproximadamente 92% de colágeno tipo II em sua composição proteica, apresentou efeito sobre o fenótipo condrocítico, impedindo a não diferenciação celular, resultante da falta de sítios de ligação à integrina e da existência de um mecanismo de ligação alternativo, de tal forma que as células mantivessem sua forma arredondada (SEWING et al., 2015).

A atuação do colágeno hidrolisado de medusa da espécie *R. esculentum* sobre a hipertensão renovascular também foi avaliada após a administração oral desses hidrolisados durante 30 dias em ratos (ZHUANG et al., 2012). Os autores observaram a atuação dos peptídeos na redução significativa da concentração de angiotensina II nos rins dos animais estudados, bem como a diminuição dos batimentos cardíacos.

Estudos utilizando o colágeno de *R. esculentum* na conservação do fenótipo condrogênico de condrocitos de células suínas em matrizes 2D e 3D, juntamente com sua boa disponibilidade e manuseio, mostrou-se como um material promissor para a aplicação em dispositivos biomédicos, especialmente para a regeneração da cartilagem humana (SEWING et al., 2015). A utilização de colágeno de *Rhizostoma pulmo*, na produção de biosensores para diagnóstico de doenças relacionadas a trombina, permitiram a conclusão que podem substituir facilmente a utilização dos colágenos bovino e suíno (DERKUS et al., 2016). Em seu estudo sobre a utilização de colágeno de *R. pulmo*, Addad e colaboradores (2011) descreveram o impacto biológico observado nas células humanas quando comparado com o colágeno tipo I de mamíferos, testado por ensaios de citotoxicidade e adesão. Os autores também salientaram a necessidade de investigações posteriores sobre os mecanismos de interação celular, mas concluíram que tanto as integrinas quanto os receptores de sulfato de heparano das células humanas são capazes de reconhecer o colágeno da água-viva, sugerindo que após a implantação *in*

vivo, o colágeno da água-viva seria capaz de induzir respostas semelhantes em termos de adesão, proliferação ou migração celular (ADDAD et al., 2011).

Atividades biológicas do colágeno de origem marinha e seus hidrolisados

Segundo Fonseca (2014), em peptídeos de origem animal, de diversas fontes como o leite, ovos e pescado, já foram observados efeitos benéficos, reforçando seu potencial como fonte de peptídeos com atividades biológicas (FONSECA et al., 2014; MATSUI et al., 2018). A aplicação de hidrolisados, principalmente de origem marinha, com potencial bioativo, relacionados ao sistema imunológico, anti-hipertensivo, antioxidante, entre outros, tem sido demonstrada (YOU et al., 2009; 2011; FONSECA, 2014; CHEN et al., 2016; CHAI et al., 2017; FELICIAN et al., 2018). No entanto, alguns fatores ainda precisam ser elucidados, como a estrutura do peptídeo ou dos aminoácidos que os compõem, peso molecular e o mecanismo de atuação destas moléculas, que contribuem para a atividade biológica (FONSECA et al., 2014).

A procura por peptídeos que apresentem atividade antioxidante aumentou na última década, uma vez que a popularidade dos radicais livres entre consumidores tem demandado mais atenção da indústria (CHAI et al., 2017; MATSUI et al., 2018). Os radicais livres e seus precursores, as espécies reativas de oxigênio (EROs), são moléculas que procuram sua estabilidade eletrônica através da captura de elétrons de outras moléculas, como proteínas, açúcares, lipídeos e moléculas de DNA. Estas, ao serem atacadas pelos radicais, se desestabilizam eletronicamente, desencadeando uma série de reações de produção e estabilização de radicais livres, o que acarreta a lesão celular e de tecidos (FONSCECA, 2014). Para frear o ataque dessas moléculas oxidantes, outras moléculas podem ser utilizadas para estabilizar, minimizar ou quebrar as reações, diminuindo os efeitos da oxidação; são as chamadas moléculas antioxidantes (MITTLER, 2002). A produção de radicais livres é um processo que ocorre virtualmente em todos os organismos vivos, principalmente porque são produzidos indiretamente em diversas vias metabólicas importantes. Porém, em eventos específicos, onde a produção de radicais livres e EROs é exagerada, o sistema antioxidante inato dos organismos, muitas vezes não consegue suprir a demanda. E esse processo leva ao chamado estresse oxidativo, associado a origem de muitas doenças, como a aterosclerose, câncer, envelhecimento e outros (CORROCHANO et al., 2018, CAROCHO et al., 2018). Para auxiliar o sistema antioxidante dos organismos, é comum a recorrente utilização de antioxidantes. Tanto por suplementação alimentar, quanto

pelo consumo de alimentos que os contenham em sua composição. Dentre os alimentos que apresentam maiores concentrações em antioxidantes estão os de origem vegetal, como frutas, verduras e legumes, com quantidades consideráveis de carotenoides, flavonoides, clorofila e vitaminas A, C e E, que são agentes capazes de frear as reações em cadeia e as lesões causadas pelos radicais livres e espécies reativas (BIANCHI & ANTUNES, 1999). No entanto, o tabagismo, alcoolismo e má qualidade de vida, favorecem o estresse oxidativo, levando ao aumento da demanda por fontes antioxidantes (LIU et al., 2018). Na indústria alimentícia, as utilizações de antioxidantes em alimentos evitam a lipoperoxidação nos produtos, aumentando o tempo de prateleira e impedindo a deterioração dos mesmos (CAROCHO et al., 2018; CÖMERT & GÖKMEN, 2017).

Neste sentido, a busca por fontes de peptídeos naturais que possam apresentar atividade antioxidante vem crescendo, principalmente como alternativa para a utilização de antioxidantes sintéticos. São atualmente utilizados pela indústria, o terc-butil-hidroquinona (TBHQ), o hidroxianisol de butila (BHA) e o hidroxitolueno de butila (BHT), que já vem sofrendo limitações em diversos países por apresentarem malefícios à saúde (CAROCHO et al., 2018; FENG et al., 2018). Testes *in vitro* têm demonstrado o potencial risco à saúde do TBHQ e BHA, o que fez com que países como Canadá e a União Europeia restringissem o uso destes antioxidantes sintéticos em alimentos (SHAHIDI & AMBIGAIPALAN, 2015). Desta forma, a busca por antioxidantes provindos de peptídeos naturais cresceu nos últimos anos, principalmente pelo apelo dos consumidores por produtos mais saudáveis, seguros e naturais (FONSECA et al., 2014; CAROCHO et al., 2018).

Estudos da utilização de colágeno hidrolisado advindo de peixes e águas-vivas tem mostrado resultados satisfatórios em relação à atividade antioxidante e anti-fadiga (DING et al., 2011; YOU et al., 2011; XU et al., 2017) em testes realizados *in vitro* e *in vivo*. Ding e colaboradores (2011) analisaram diversos parâmetros bioquímicos, como ácido láctico no sangue, conteúdo de nitrogênio uréico no sangue (NUS) e glicogênio hepático e glicogênio muscular, para mensurar o efeito da fadiga. Também determinaram a concentração de monodesidroascorbato (MDA), superóxido dismutase (SOD) e glutatona-peroxidase (GSH-Px) para mensurar a atividade antioxidante no sangue e fígado dos ratos submetidos à alimentação com os extratos de colágeno hidrolisado em diferentes concentrações (Alto, 10 mg/kg de animal e Baixo, 5 mg/kg de

animal). Os autores observaram que as diferentes concentrações do extrato apresentaram efeitos sobre os parâmetros analisados, principalmente o efeito positivo anti-fadiga. Os resultados para os grupos de estudo foram significativos na diminuição do conteúdo de nitrogênio ureico no sangue (NUS) em relação ao grupo controle. Níveis reduzidos de NUS refletem a redução do metabolismo proteico, o que é indicativo de maior resistência a fadiga. No entanto, a atividade antioxidante não diferiu entre os tratamentos. Por outro lado, outros estudos que testaram a atividade antioxidante *in vitro*, como realizado por Zhuang (2009), utilizando colágeno hidrolisado da mesma espécie de medusa, verificaram maior atividade sequestradora do radical DPPH (69,5 %), bem como maior atividade quelante de íons cobre (56,5%). Estes resultados também foram descritos por Zhuang e colaboradores (2010), os quais relataram valores semelhantes para os mesmos parâmetros analisados como também resultados positivos na inibição da lipoperoxidação e 55,4% de atividade no sequestro do radical hidroxila. Isso pode estar relacionado às propriedades dos peptídeos, as quais influenciam na atividade biológica que os mesmos apresentam, como o peso molecular do peptídeo, a composição de aminoácidos, o aminoácido terminal, a presença de cadeia ramificadas, bem como o grau de hidrólise do hidrolisado (ZHUANG et al., 2009; FONSECA, 2014; BARZIDEH et al., 2014).

Ohashi et al. (2015) examinaram a influência do tipo e número de cadeias laterais de aminoácidos extraído de hidrolisados de soja e a correlação entre os métodos antioxidantes mais utilizados. Os autores observaram que os tripeptídeos contendo duas tirosinas e tripeptídeos contendo duas histidinas mostraram maior correlação com os ensaios de captura do radical ABTS⁺ e com a capacidade de absorção do radical oxigênio, bem como a correlação entre os ensaios. Salientam, ainda, que o uso combinado destes ensaios tem potencial para rastrear a atividade antioxidante no curso do isolamento de peptídeos antioxidantes. As características químicas e físicas únicas relacionadas à sequência de aminoácidos e à estrutura do peptídeo são fatores importantes que determinam suas atividades antioxidantes (ELIAS et al. 2008). Embora os resíduos de aminoácidos devam ter atividade antioxidante contra diferentes ERO e ERN, a quantidade de pesquisas abrangentes sobre esse assunto é limitada. Uma razão pela qual a pesquisa é limitada é porque os métodos convencionais utilizados para avaliar os antioxidantes são muito demorados (MATSUI et al., 2018). Um aspecto relevante é o fato já observado por Molyneux (2004) e confirmado por nosso grupo de

pesquisa, sobre a interação entre a amostra de peptídeos e os radicais usados na análise. Quando avaliado por metodologias colorimétricas, os reagentes podem causar a precipitação de proteínas das amostras, produzindo opacidade e distorcendo os resultados. Segundo Fonseca (2014), pesquisas que estudem a relação entre essas características devem ser realizadas para elucidar os mecanismos de atuação desses peptídeos como moléculas antioxidantes, bem como a utilização desses peptídeos pela indústria alimentícia. A utilização de hidrolisados de colágeno para esses fins, pode estar ligada à presença de peptídeos contendo prolina e glicina, já que os mesmos desempenham papel importante na doação de prótons para radicais deficientes em elétrons (FELICIAN et al., 2018). Essa composição torna esses peptídeos potenciais agentes antioxidantes, podendo atuar como substitutos dos antioxidantes sintéticos encontrados no mercado (ZHUANG et al., 2009; GÓMEZ-GUILLÉN et al., 2011; FONSCECA, 2014).

Estudos sobre outras atividades biológicas das proteínas colagenosas de medusas e seus peptídeos têm sido realizados. Morishige et al. (2011), através de estudos *in vitro*, observaram que o efeito da ingestão de extratos de colágeno de *Nemopilema nomurai* na dieta durante 14 dias em ratos, estimulou a atividade de produção de IgG em esplenócitos e a atividade de produção de IgA em linfócitos das placas de Peyer, indicando a potencial utilização deste colágeno como alimento funcional. Os efeitos do extrato de colágeno da água-viva *Nemopilema nomurai* no estímulo a produção de imunoglobulinas e citocinas por linfócitos e macrófagos *in vitro* e *in vivo* também foram investigados por Nishimoto et al. (2014) e Putra et al. (2015).

A atividade inibitória da enzima conversora de angiotensina I foi investigada por Barzideh et al. (2014). Utilizando colágeno isolado da medusa *Chrysaora sp.*, os autores utilizaram três proteases diferentes (tripsina, alcalase e Protamex) para obter peptídeos bioativos. O efeito da duração da hidrólise na atividade antioxidante e na atividade inibitória da enzima conversora de angiotensina I dos peptídeos foi avaliado. A atividade de poder antioxidante redutor de ferro foi mais alta em hidrolisados produzidos com a Protamex e com tripsina por 7 e 9 horas, respectivamente. Por outro lado, os hidrolisados produzidos pela tripsina por 1 e 3 horas apresentaram as maiores atividades de eliminação do radical DPPH (94 e 92%, respectivamente). Os hidrolisados produzidos pela tripsina (por 3 h) também apresentaram a maior atividade inibitória da enzima conversora de angiotensina I (89%).

Liu e colaboradores (2013) também investigaram a utilização de dois peptídeos inibitórios de enzima conversora de angiotensina I, isolados de hidrolisados de colágeno da medusa *R. esculentum* e o resultado do ensaio de atividade inibitória *in vitro* mostrou o valor de IC50 de 80,67 μ M e 32,56 μ M, respectivamente. A administração oral dos dois peptídeos poderia reduzir a pressão arterial em ratos hipertensivos e indicar que esses peptídeos podem ser usados como ingredientes em alimentos funcionais e suplementos dietéticos ou até mesmo produtos farmacêuticos como agentes anti-hipertensivos.

2. CONCLUSÕES

A crescente demanda mundial por alimentos e produtos mais saudáveis faz com que as indústrias busquem o melhoramento na gestão de recursos, bem como o investimento em pesquisas que prospectem novas fontes de proteínas. As medusas, presentes na parcela descartada das pescas não intencionais, surgem como uma alternativa para este objetivo, uma vez que as aplicações das proteínas extraídas destes animais têm mostrado resultados satisfatórios em diversas áreas.

No Brasil não há relatos sobre a utilização de colágeno provindo de medusas, uma vez que a agroindústria gera matérias primas secundárias que são utilizadas na produção de colágeno. O colágeno extraído de águas vivas pode substituir parte dessas matérias primas, de origem bovina e suína, além de já ter mostrado resultados positivos na prospecção de peptídeos com atividade biológica. Na medida que a gestão dos recursos pesqueiros tem sido discutida com mais frequência, devido ao aumento das restrições de pesca pelo governo, pelo excesso de resíduos gerados pelas empresas do setor e os impactos que podem causar ao meio ambiente, as demandas por produtos advindos dessa matéria prima serão cada vez mais explorados, permitindo potenciais avanços em áreas como a nutrição funcional e medicina.

3. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Addad, S.; Exposito, J.Y.; Faye, C.; Ricard-Blum, S.; Lethias, C. 2011. Isolation, Characterization and Biological Evaluation of Jellyfish Collagen for Use in Biomedical Applications. **Marine Drugs**, 9(6):967-983. <http://dx.doi.org/10.3390/md9060967>.

- Amorim, R.G.O.; Deschamps, F.C.; Pessatti, M.L. 2016. Protein hydrolysate waste of whitemouth croaker (*Micropogonias furnieri*) as a way of adding value to fish and reducing the environmental liabilities of the fishing industry . **Latin American Journal of Aquatic Research**, 44(5): 967-974.
- Aouacheria, A.; Cluzel, C.; Lethias, C.; Gouy, M.; Garrone, R.; Exposito, J.Y.; 2004. Invertebrate Data Predict an Early Emergence of Vertebrate Fibrillar Collagen Clades and an Anti-incest Model. **Journal Of Biological Chemistry**, 279(46): 47711-47719. <http://dx.doi.org/10.1074/jbc.m408950200>.
- Arnesen , J.A.; Gildberg, A. 2002. Preparation and characterisation of gelatine from the skin of harp seal (*Phoca groenlandica*). **Bioresour Technol.** 82(2):191-4.
- Asche, F.M.; Bellemare, M. F.; Roheim, C.; Smith, M.D.; Tveteras, S. 2015. Fair Enough? Food Security and the International Trade of Seafood. **World Development**. 67: 151-160. <https://doi.org/10.1016/j.worlddev.2014.10.013>
- Barzideh, Z.; Latiff, A. A.; Gan, C.Y.; Abedin, Z.; Alias, A. K. 2014. ACE Inhibitory and Antioxidant Activities of Collagen Hydrolysates from the Ribbon Jellyfish (*Chrysaora* sp.). **Food Technology And Biotechnology**, 52(4): 495-504.<http://dx.doi.org/10.17113/ftb.52.04.14.3641>.
- Belton, B.; Bush, S. R.; Little, D.C. 2018. Not just for the wealthy: Rethinking farmed fish consumption in the Global South. **Global Food Security**, 16: 85-92. <https://doi.org/10.1016/j.gfs.2017.10.005>
- Bhagwat, P.K.; Dandge, P. B. 2018. Collagen and collagenolytic proteases: A review. **Biocatalysis And Agricultural Biotechnology**, 15: 43-55. <http://dx.doi.org/10.1016/j.bcab.2018.05.005>.
- Bianchi, M.L.P.; Antunes, L.M.G. 1999 Radicais livres e os principais antioxidantes da dieta. **Revista de Nutrição**, 12 (2): 123-130.
- Cañas, J.A.; Rodrigo-Muñoz J.M.; Rondon-Cepeda, S. H.; Bordehore, C.; Fernández-Nieto, M.; Pozo, V. 2018. Jellyfish collagen. **Annals Of Allergy, Asthma & Immunology**, 120(4): 430-431. <http://dx.doi.org/10.1016/j.anai.2018.01.018>.
- Carocho, M.; Morales, P.; Ferreira, I.C.F.R. 2018. Antioxidants: Reviewing the chemistry, food applications, legislation and role as preservatives. **Trends In**

- Castello, L.; 2008. Re-pensando o estudo e o manejo da pesca no Brasil. **Pan-American Journal of Aquatic Sciences** , 3 (1): 18-22.
- Chai T.T.; Law, Y.C.; Wong, F.C.; Kim, S.K. 2017. Enzyme-Assisted Discovery of Antioxidant Peptides from Edible Marine Invertebrates: A Review. **Marine Drugs**, 15(2): 42-26.<http://dx.doi.org/10.3390/md15020042>.
- Chen, S.; Chen, H.; Xie, Q.; Hong, B.; Chen, J.; Hua, F.; Bai, K.; He, J.; Yi, R.; Wu, H. 2016. Rapid isolation of high purity pepsin-soluble type I collagen from scales of red drum fish (*Sciaenops ocellatus*). **Food Hydrocolloids**. 52: 468-477.
<https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2015.07.027>.
- Cheng, J.S.; Shao, Z.; Li, C.; Yu, L.; Raja, M.A.; Liu, C. 2009. Collagen VI protects neurons against A β toxicity. **Nature Neuroscience**, 12(2): 119-121.
<http://dx.doi.org/10.1038/nn.2240>.
- Cheng, X.; Shao, Z.; Li, C.; Yu, L.; Raja, M.A. Liu, C. 2016. Isolation, Characterization and Evaluation of Collagen from Jellyfish *Rhopilema esculentum* Kishinouye for Use in Hemostatic Applications. **Plos One**, 12(1): 1-21.<http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0169731>.
- Cho, S. M.; Kwak, K.S.; Park, D.C.; Gu, Y.S.; Ji, C.I.; Jang, D.H.; Lee, Y.B.; Kim, S.B. 2004 Processing optimization and functional properties of gelatin from shark (*Isurus oxyrinchus*) cartilage. **Food Hydrocolloids**, 18 (4): 573-579.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.foodhyd.2003.10.001>.
- Cisneros-Montemayor, A. M.; Harper, S.; Tai, T.C. 2018. The market and shadow value of informal fish catch: a framework and application to Panama. **Natural Resources Forum**, 42 (2): 83-92. <https://doi.org/10.1111/1477-8947.12143>
- Clark, Timothy P.; Longo, S.B.; Clark, B.; Jorgenson, A.K. 2018. Socio-structural drivers, fisheries footprints, and seafood consumption: A comparative international study, 1961-2012. **Journal of Rural Studies**, 57:140-146
<http://dx.doi.org/10.1016/j.jrurstud.2017.12.008>.

- Cömert , E.D.; Gökmen, V. 2017. Evolution of food antioxidants as a core topic of food science for a century. **Food Res Int.**, 105: 76-93. doi: 10.1016/j.foodres.2017.10.056.
- Condon, R.H.; Graham, W.H.; Duarte, C.M.; Pitt, K.A.; Lucas, C.H.; Haddock , S.H.D.; Sutherland, K. R.; Robinson , K.L.; Dawson, M.N.; Decker, M.B.; Mills, C.E.; Purcell, J. E.; Malej, A.; Mianzan, H.; , S.; Gelcich, S.; Madin, L.P. 2012. Questioning the Rise of Gelatinous Zooplankton in the World's Oceans. **BioScience**, 62 (2): 160–169. <https://doi.org/10.1525/bio.2012.62.2.9>
- Corrochano, A.R.; Buckin, V.; Kelly, P.M.; Giblin, L. 2018. Invited review: Whey proteins as antioxidants and promoters of cellular antioxidant pathways. **Journal of Dairy Science**, 101(6): 4747-4761. <http://dx.doi.org/10.3168/jds.2017-13618>.
- Damodaran, S.; Parkin, K.L.; Fennema, O.R. **Química de Alimentos de Fennema**. 4. ed., Porto Alegre: Artmed, 2010, 900p
- Derkus, B.; Arslan, Y. E.; Bayrac, A. T.; Kantarcioglu, I.; Emrugel, K. C.; Emrugel, E. 2016. Development of a novel aptasensor using jellyfish collagen as matrix and thrombin detection in blood samples obtained from patients with various neurodisease. **Sensors and Actuators B: Chemical**, 228: 725-736. <http://dx.doi.org/10.1016/j.snb.2016.01.095>.
- Ding, J. F.; Li, Y. Y.; Xu, J. J.; Su, X. R.; Gao, X.; Yue, F. P. 2011. Study on effect of jellyfish collagen hydrolysate on anti-fatigue and anti-oxidation. **Food Hydrocolloids**, 25(5): 1350-1353. <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodhyd.2010.12.013>.
- Ding, O.; Chen, X.; Hilborn, R.; Chen, Y. 2017. Vulnerability to impacts of climate change on marine fisheries and food security **Marine Policy**, 83: 55:61
- Duan, R.; Zhuang, J.; Du, X.; Yao, X.; Konno, K. 2009. Properties of collagen from skin, scale and bone of carp (*Cyprinus carpio*). **Food Chemistry**, 112(3): 702-706. <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2008.06.020>.
- Elias, R. J.; Kellerby, S. S.; Decker, E.A. 2008. Antioxidant Activity of Proteins and Peptides. **Critical Reviews In Food Science And Nutrition**, 48(5): 430-441. <http://dx.doi.org/10.1080/10408390701425615>.

- Fauzi, M.B.; Lokanathan, Y.; Aminuddin, B.S.; Ruszymah, B.H.I.; Chowdhury, S.R. Ovine tendon collagen: Extraction, characterisation and fabrication of thin films for tissue engineering applications. **Materials Science And Engineering: C**, 68: 163-171. <http://dx.doi.org/10.1016/j.msec.2016.05.109>.
- Felician, F. F.; Xia, C.; Qi, W.; Xu, H.; 2018. Collagen from Marine Biological Sources and Medical Applications. **Chemistry & Biodiversity**, 15(5): 1-18. <http://dx.doi.org/10.1002/cbdv.201700557>.
- Feng, Y.; Ruan, G. R.; Jin, F.; Xu, J.; Wang, F. J. 2018. Purification, identification, and synthesis of five novel antioxidant peptides from Chinese chestnut (*Castanea mollissima* Blume) protein hydrolysates. **Lwt**, 92: 40-46 <http://dx.doi.org/10.1016/j.lwt.2018.01.006>.
- Ferreira, A. M.; Gentile, P.; Chiono, V.; Ciardelli, G. 2012. Collagen for bone tissue regeneration. **Acta Biomaterialia**, 8(9): 3191-3200. <http://dx.doi.org/10.1016/j.actbio.2012.06.014>.
- Fonseca, Renata Aline dos Santos da. 2014. Atividade antioxidante de peptídeos provenientes de hidrolisado proteico de bijupirá (*Rachycentron Canadum*). Tese de Mestrado. Curso de Programa de Pós-graduação em Engenharia e Ciência de Alimentos, Universidade Federal do Rio Grande, Rio Grande. 128 p.
- Food and Agriculture Organization of The United Nations. 2014. Yearbook of fisher Statistics: summary tables. **FAO**, Roma.
- Food and Agriculture Organization of The United Nations. 2016. The State of World Fisheries and Aquaculture 2016. Contributing to food security and nutrition for all. Rome. 200 pp
- Gelse, K. 2003. Collagens—structure, function, and biosynthesis. **Advanced Drug Delivery Reviews**, 55(12): p.1531-1546. <http://dx.doi.org/10.1016/j.addr.2003.08.002>.
- Ghaly A.E.; Ramakrishnan, V.V.; Brooks, M.S.; Budge, S.M.; Dave, D. 2013. Fish Processing Wastes as a Potential Source of Proteins, Amino Acids and Oils: A Critical Review. **J Microb Biochem Technol** 5: 107-129. doi:10.4172/1948-5948.1000110

- Ghazanfari, S.; Khademhosseini, A.; Smit, T.H. 2016. Mechanisms of lamellar collagen formation in connective tissues. *Biomaterials*. 97: 74-84. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2016.04.028>
- Gómez-guillén, M.C.; Giménez, B.; López-Caballero, M.E.; Montero, M.P. 2011. Functional and bioactive properties of collagen and gelatin from alternative sources: A review. *Food Hydrocolloids*, 25(8): 1813-1827. <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodhyd.2011.02.007>.
- Gonçalves, G.R.; Oliveira, M.A.S; Moreira, R.F; Brito, D. 2015. Benefícios da ingestão de colágeno para o organismo humano. *Revista Eclesiástica Brasileira*. 8(2): 190-207.
- Gordon, M.K.; Hahn, R.A. 2010. Collagens. *Cell Tissue Res*. 339: 247. <https://doi.org/10.1007/s00441-009-0844-4>.
- Grafton, Q.R.; Kompas, T.; Hilborn, R. 2010. Limits to the Privatization of Fishery Resources: Comment *Land Economics*. 86(3): 609-613
- Graham, W. M.; Gelcich, S.; Robinson, K. L.; Duarte, C. M.; Brotz, L.; Purcell, J. E.; Madin, L. P.; Mianzan, H.; Sutherland, K. R.; Uye, S.; Pitt, K. A.; Lucas, C. H.; Bøgeberg, M.; Brodeur, R. D.; Condon, R. H. 2014. Linking human well-being and jellyfish: ecosystem services, impacts, and societal responses. *Frontiers In Ecology And The Environment Ecological Society of America*, 12(9): 515-523.
- Gupta, A.; Singh, S. 2014 Evaluation of anti-inflammatory effect of *Withania somnifera* root on collagen-induced arthritis in rats. *Pharmaceutical Biology*, 52 (3): 308-320. <http://dx.doi.org/10.3109/13880209.2013.835325>.
- Haddad JR, V.; Silveira, F.L.D.; Migotto, A.E. 2010. Skin lesions in envenoming by cnidarians (Portuguese Man-of-war and Jellyfish): Etiology and severity of accidents on the Brazilian Coast. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*, 52(1): 1-4.
- Haddad, V. JR.; Cardoso, J. L. C.; Silveira, F. L. 2001. Seabather's eruption: report of five cases in southeast region of Brazil. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*, 43(3): 171-172.

- Haddad, V. JR.; Silveira, F. L.; Cardoso, J. L. C.; M, A. C. 2002. A report of 49 cases of cnidarian envenoming from southeastern Brazilian coastal waters. **Toxicon** , 40(10): 1445-1450.
- Hall, M.A.; Alverson, Dayton L.; Metuzals, K. I. 2000. By-Catch: Problems and Solutions. **Marine Pollution Bulletin**, 41(1-6): 204-219.
[http://dx.doi.org/10.1016/s0025-326x\(00\)00111-9](http://dx.doi.org/10.1016/s0025-326x(00)00111-9).
- Hoyer, B.; Bernhardt, A.; Lode, A.; Heinemann, S.; Sewing, J.; Klinger, M.; Notbohm, H.; Gelinsky, M. 2014. Jellyfish collagen scaffolds for cartilage tissue engineering. **Acta Biomaterialia**, 10(2): 883-892.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.actbio.2013.10.022>.
- Hsieh, Y. H. P.; Rudloe, J. 1994. Potential of utilizing jellyfish as food in Western countries. **Trends in Food Science & Technology**, 5(7): 225-229.
- Hsieh, Y.H.P.; Leong F.M; Rudloe, J. 2001. Jellyfish as food. **Hydrobiologia**, 451(1-3): 11–17.
- Kawahara, M.; Uye, S.; Ohtsu, K.; Iizumi, H. 2006. Unusual population explosion of the giant jellyfish *Nemopilema nomurai* (Scyphozoa: Rhizostomeae) in East Asian waters. **Marine Ecology Progress Series**, 307: 161–173.
doi:10.3354/meps307161.
- Kelleher, K. 2005. Discards in the world's marine fisheries. An update. Fisheries Technical Paper, **FAO**, 131pp.
- Khong, N. M.H.; Yusoff, F. Md., Jamilah, B.; Basri, M.; Maznah, I.; Chan, K.W.; Armania, N.; Nishikawa, J. 2018. Improved collagen extraction from jellyfish (*Acromitus hardenbergi*) with increased physical-induced solubilization processes. **Food Chemistry**, 251: 41-50.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.12.083>.
- Kittiphattanabawon, P; Benjakul, S.; Visessanguan, W.; Shahidi, F. 2010. Isolation and characterization of collagen from the cartilages of brownbanded bamboo shark (*Chiloscyllium punctatum*) and blacktip shark (*Carcharhinus limbatus*). **LWT - Food Science and Technology**, 43: 792-800.
- Krishnan, S.; Perumal, P. 2013. Preparation and biomedical characterization of jellyfish (*Chrysaora quinquecirrha*) collagen from southeast coast of India.

International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences, 5(3): 698-701.

- Lobo, A.S.; Balmford, A.; Arthur, R.; Manica, A. 2010. Commercializing bycatch can push a fishery beyond economic extinction. **Conservation Letters**, 3(4): 277-285. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1755-263x.2010.00117.x>.
- Li, J.; Li Q, Li J, Zhou B. 2014. Peptides Derived from *Rhopilema esculentum* Hydrolysate Exhibit Angiotensin Converting Enzyme (ACE) Inhibitory and Antioxidant Abilities. **Molecules**, 19(9): 13587-13602. <http://dx.doi.org/10.3390/molecules190913587>.
- Li, Q.; Um, L.; Zhang, F.; Sun, Y.; Chen, Q.; Xie, C.; Wnag, H. 2017. A novel fish collagen scaffold as dural substitute. **Materials Science And Engineering: C**, 8: 346-351. <http://dx.doi.org/10.1016/j.msec.2017.05.102>.
- Lin, L.; Regenstien, J.M.; Lv, S.; Lu, J.; Jiang, S. 2017. An overview of gelatin derived from aquatic animals: Properties and modification. **Trends In Food Science & Technology**, 68: 102-112. <http://dx.doi.org/10.1016/j.tifs.2017.08.012>.
- Liu, X.; Zhang, M.; Jia, A.; Zhang, Y.; Zhu, H.; Zhang, C.; Sun, Z.; Liu, C. 2013. Purification and characterization of angiotensin I converting enzyme inhibitory peptides from jellyfish *Rhopilema esculentum*. **Food Research International**, 50(1): 339-343. <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodres.2012.11.002>.
- Liu, Z.; Ren, Z.; Zhang, J.; Chuang, C.C.; Kandaswamy, E.; Zhou, T.; Zuo, L. 2018. Role of ROS and Nutritional Antioxidants in Human Diseases. **Frontiers In Physiology**, 9: 1-18. <http://dx.doi.org/10.3389/fphys.2018.00477>.
- Lopes, P. F. M.; Pennino, M. G.; Freire, F. 2017. Climate change can reduce shrimp catches in equatorial Brazil. **Regional Environmental Change**, 18(1): 223-234. <http://dx.doi.org/10.1007/s10113-017-1203-8>.
- MAPA - Ministério da Pesca e da Aquicultura. Plano Safra - Pesca e aquicultura. Brasília. 2015-2016
- Martins, V.G.; Costa, J.A.V.; Prentice-Hernández, C.; 2009. Hidrolisado protéico de pescado obtido por vias química e enzimática a partir de corvina (*Micropogonias furnieri*). **Quim. Nova**, 32(1):61-66.

- Matsui, R.; Honda, R.; Kanome, M.; Hagiwara, A.; Matsuda, Y.; Togitani, T.; Ikemoto, N.; Terashima, M. 2018. Designing antioxidant peptides based on the antioxidant properties of the amino acid side-chains. **Food Chemistry**, 245: 750-755. <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.11.119>.
- Mayne, R.; Brewton, R.G.; Mayne, P.M.; Baker, J.R.; 1993. Isolation and characterization of the chains of type V/type XI collagen present in bovine vitreous. **J Biol Chem**, 268(13):9381-6.
- McCaughran, D. A, R. W.; Schoning, R. W. Jacobson, D. L. Alverson, T. H. Gentle, Auyong, J. 1992. Standardized nomenclature and methods of defining bycatch levels and implications. Proceedings of the National Industry Bycatch Workshop, **Natural Resources Consultants**.
- Medeiros, S. D. 2017. Influência da introdução de nova tecnologia de armazenagem e conservação do pescado sobre a operação da frota de pesca insuatrial no cerco no sudeste e sul do Brasil. Tese de Doutorado. Universidade do Vale do Itajaí – UNIVALI. 153 p.
- Miller, E.J.; Gay, S. 1982. Collagen: An Overview. **Methods in Enzymology**, 82: 1-32.
- Mills, C. E. Jellyfish blooms: are populations increasing globally in response to changing ocean conditions?. **Hydrobiologia**, 451(1-3):55-68.
- Mittler, R.. 2002. Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. *Trends in Plant Science*, 7(9): 405-410.
- Miura, S.; Kimura, S. 1985 Jellyfish mesogloea collagen. Characterization of molecules as $\alpha 1\alpha 2\alpha 3$ heterotetramers. **Journal of Biological Chemistry**, 260(28): 15352-15356.
- Molyneux, P. 2004. The Use of Stable Free Radical Diphenylpicrylhydrazyl (DPPH) for Estimating Antioxidant Activity. **Songklanakarin Journal of Science and Technology**, 26: 211-219.
- Morandini, A.C.; Ascher, D.; Stampar, S.N.; F, J.F.V. 2005. Cubozoa e Scyphozoa (Cnidaria: Medusozoa) de águas costeiras do Brasil. **Iheringia. Série Zoologia**, 95(3): 281-294.

- Morishige, H.; Sugahara, T.; Nishimoto, S.; Muranaka, A.; Ohno, F.; Shiraishi, R.; Doi M. 2011. Immunostimulatory effects of collagen from jellyfish in vivo. **Cytotechnology**, 63(5): 481-492.
- Nagai, T.; Worawattanamatekul, W.; Suzuki, N.; Nakamura, T.; Ito T.; Fujiki K. 2000. Isolation and characterization of collagen from rhizostomous jellyfish (*Rhophilema asamushi*). **Food Chemistry**, 70 (2): 205–208.
- Nagata, R.M.; Haddad, M.A.; Nogueira; JR. M. 2009. The nuisance of medusae (Cnidaria, Medusozoa) to shrimp trawls in central part of southern Brazilian Bight, from the perspective of artisanal fishermen. **Pan-American Journal of Aquatic Sciences**, 4(3): 312-325.
- Nam, K.; You, S.; Kim, S. 2008. Molecular and Physical Characteristics of Squid (*Todarodes pacificus*) Skin Collagens and Biological Properties of Their Enzymatic Hydrolysates. **Journal of Food Science**, 73(4): 249-255. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1750-3841.2008.00722.x>.
- Nishimoto, S.; Goto, Y.; Morishige, H.; Shiraishi, R.; Doi, M.; Akiyama, K.; Yamauchi, S.; Sugahara, T.; 2008. Mode of Action of the Immunostimulatory Effect of Collagen from Jellyfish. **Bioscience, Biotechnology, And Biochemistry**, 72(11): 2806-2814 <http://dx.doi.org/10.1271/bbb.80154>.
- Nogueira JR. M. 2006 **Macrozooplâncton gelatinoso do litoral do Paraná: Composição, abundância e aspectos ecológicos**. Dissertação de Mestrado. Curso de Pós-graduação em Ciências Biológicas – Zoologia, Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná. 156f.
- Nogueira, JR. M.; Haddad, M. A. 2006. Relações de tamanho e peso das grandes medusas (Cnidaria) do litoral do Paraná, Sul do Brasil. **Revista Brasileira de Zoologia**, 23 (4): 1231–1234.
- Ohashi, Y.; Onuma, R.; Naganuma, T.; Ogawa, T.; Naude, R.; Nokihara, K.; Muramoto, K. 2015. Antioxidant Properties of Tripeptides Revealed by a Comparison of Six Different Assays. **Food Science And Technology Research**, 21(5): 695-704. <http://dx.doi.org/10.3136/fstr.21.695>.
- Oliveira, V.M.; Cunha, M. N. C.; Nascimento, T. P.; Assis, C. R. D.; Bezerra, R.S.; Porto, A.L. F. 2017. Colágeno: características gerais e produção de peptídeos

- bioativos - uma revisão com ênfase nos subprodutos do pescado. **Acta of Fisheries and Aquatic Resources**. 5(2): 70-82.10.2312/ActaFish.2017.5.2.70-82
- Omori, M.; Nakano, E. 2001. Jellyfish fisheries in southeast Asia. **Hydrobiologia**, 451 (1/3): 19-26.
- Park, S. Y.; Kim, Y. S.; Ahn, C.B.; Je, J. Y. 2016. Partial purification and identification of three antioxidant peptides with hepatoprotective effects from blue mussel (*Mytilus edulis*) hydrolysate by peptic hydrolysis. **Journal Of Functional Foods**, 20: 88-95<http://dx.doi.org/10.1016/j.jff.2015.10.023>.
- Perez, J.A.A.; Wahrlich, R. 2005. A *bycatch* assessment of the gillnet monkfish *Lophius gastrophysus* fishery off southern Brazil. **Fisheries Research**, 72(1) : 81-95. <https://doi.org/10.1016/j.fishres.2004.10.011>
- Prestes, R. C.; Golunski, S. M.; Toniazzi, G.; Kempka, A. P.; Luccio, M. 2013. **Revista Brasileira de Produtos Agroindustriais**, 15 (4): 375-382.
- Prestes, R.C. 2013. Colágeno e Seus Derivados: Características e Aplicações em Produtos Cárneos. **UNOPAR Científica Ciências Biológicas e da Saúde**,15(1): 65-74.
- Pott, C.; Wiedenfeld, D. A. 2017. Information gaps limit our understanding of seabird bycatch in global fisheries. **Biological Conservation**, 210: 192-204.. <http://dx.doi.org/10.1016/j.biocon.2017.04.002>.
- Purcell, J.E.; Uye, S.I.; Lo, W.T. 2007. Anthropogenic causes of jellyfish blooms and their direct consequences for humans: a review. **Mar. Ecol. Prog. Ser.** 350: 153–174.
- Putra, A. B. N. 2015. **Studies on the stimulatory effects of jellyfish collagen on innate immune system**. Dissertação de mestrado. IYOKAN - Institutional Repository : the EHIME area <http://iyokan.lib.ehime-u.ac.jp/dspace/>.
- Putra, A. B. N., Nishia, K.; Shiraishi, R.; Doi, M.; Sugahara, T. 2015. Jellyfish collagen stimulates maturation of mouse bone marrow-derived dendritic cells. **Journal of Functional Foods**, 14: 308-317. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jff.2015.02.008>.
- Resgalla JR, C.; Gonçalves, V. C.; Klein, A. H. F. 2005. The occurrence of jellyfish stings on the Santa Catarina coast, southern Brazil. **Brazilian Journal of Oceanography**, 53(3-4): 183-186. DOI: 10.1590/s1679-87592005000200008.

- Ricard-blum, S.; The Collagen Family. 2010. **Cold Spring Harbor Perspectives In Biology**, 3 (1): 1-19. <http://dx.doi.org/10.1101/cshperspect.a004978>.
- Saldin, L. T.; Cramer, M.C.; Velankar, S.S.; White, L.J.; Badylak, S.F. Extracellular matrix hydrogels from decellularized tissues: Structure and function. *Acta Biomaterialia*, [s.l.], v. 49, p.1-15, fev. 2017. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.actbio.2016.11.068>.
- Schmidt, M. M.; Dornelles, R. C. P.; Mello, R. O.; Kubota, E. H.; Mazutti, M. A.; Kempka, A. P.; Demiate, I. M. 2016. Collagen extraction process. **International Food Research Journal** 23(3): 913-922.
- Sewing, J.; Klinger, M.; Notbohm, H. 2015. Jellyfish collagen matrices conserve the chondrogenic phenotype in two- and three-dimensional collagen matrices. **Journal Of Tissue Engineering And Regenerative Medicine**, 11 (3): 916-925. <http://dx.doi.org/10.1002/term.1993>.
- Shahidi, F.; Ambigaipalan, P. 2015. Phenolics and polyphenolics in foods, beverages and spices: Antioxidant activity and health effects – A review. **Journal of Functional Foods**, 18: 820-897. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jff.2015.06.018>.
- Sibilla, S.; Godfrey, M.; Brewer, S.; Budh-raja, A.; Genovese, L. 2015. An Overview of the Beneficial Effects of Hydrolysed Collagen as a Nutraceutical on Skin Properties: Scientific Background and Clinical Studies. **The Open Nutraceuticals Journal**, 8: 29-42.
- Siddiqui, Y.D., Arief, E.M.; Yusoff, A.; Hamid, S.S.A.; Norani, T.Y.; Abdullah, M.Y.S. 2013. Extraction, Purification and Physical Characterization of Collagen from Body wall of Sea cucumber *Bohadschia bivitatta*. **Health and the Environment Journal**. 4(2): 53-65.
- Silva, R.S.G. 2010. **Obtenção de gelatina utilizando cabeças de carpa comum (*Cyprinus carpio*): avaliação das etapas de pré-tratamento e extração** Dissertação de Mestrado. Universidade Federal Do Rio Grande. Escola De Química e Alimentos Mestrado em Engenharia e Ciência de Alimentos. 77f.
- Silva, T. F.; Penna, A.L.B. 2012. Colágeno: Características químicas e propriedades funcionais. **Revista Instituto Adolfo Lutz**, 71 (3): 530-539.

- Sugahara, T.; Ueno, M.; Goto, Y.; Shiraishi, R.; Doi, M.; Akiyama K.; Yamauchi, S. 2006. Immunostimulation Effect of Jellyfish Collagen. **Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry**, 70(9): 2131-2137. DOI: 10.1271/ bbb.60076
- Sumaila, U.R.; Cheung, W. W. L.; Lam, V. W. Y.; Pauly, D.; Herrick, S. 2011. Climate change impacts on the biophysics and economics of world fisheries. **Nature Climate Change** ,1: 449–456.
- Tomlinson, B.; Maynou, F.; Sabatés, A.; Fuentes, V.; Canepa, A.; Sastre, S. 2018. Systems approach modelling of the interactive effects of fisheries, jellyfish and tourism in the Catalan coast. **Estuarine, Coastal and Shelf Science**, 201:198-207. <https://doi.org/10.1016/j.ecss.2015.11.012>
- Wang, J.K.; Yeo, K.P.; Chuhn, Y.Y.; Tan, T.T.Y.; Tan, N.S.; Angeli, V.; Choong, C. Fish scale-derived collagen patch promotes growth of blood and lymphatic . vessels in vivo. **Acta Biomaterialia**, 63: 246-260. <http://dx.doi.org/10.1016/j.actbio.2017.09.001>.
- Xu, J.; Li, Y.; Regenstein, J.; Su, X. 2017. *In vitro* and *in vivo* anti-oxidation and anti-fatigue effect of monkfish liver hydrolysate. **Food Bioscience**, 18: 9-14. <http://dx.doi.org/10.1016/j.fbio.2017.03.002>.
- Xu, J.; Zhao, Q.; Qu, Y.; Ye, F. 2013. Antioxidant activity and anti-exercise-fatigue effect of highly denatured soybean meal hydrolysate prepared using neutrase. **Journal Of Food Science And Technology**, 52(4)1982-1992. Nature. <http://dx.doi.org/10.1007/s13197-013-1220-7>.
- You, L.; Zhao, M.; Cui, C.; Zhao, H.; Yang, B. 2009. Effect of degree of hydrolysis on the antioxidant activity of loach (*Misgurnus anguillicaudatus*) protein hydrolysates. **Innovative Food Science & Emerging Technologies**, 10 (2): 235-240.<http://dx.doi.org/10.1016/j.ifset.2008.08.007>.
- You, L.; Zhao, M.; Regenstein, J. M.; Ren, J. 2011. In vitro antioxidant activity and in vivo anti-fatigue effect of loach (*Misgurnus anguillicaudatus*) peptides prepared by papain digestion. **Food Chemistry**, 124 (1): 188-194. <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2010.06.007>.
- Zhang, J.; Duan, R.; Huang, L.; Song, Y.; Regenstein, J. M. 2014. Characterisation of acid-soluble and pepsin-solubilised collagen from jellyfish (*Cyanea nozakii*

Kishinouye). **Food Chemistry**, 150: 22-26.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2013.10.116>.

- Zhang, Q.; Wang, Q.; Lv, S.; Lu, J.; Jiang, S.; Regenstein, J.M.; Lin, L. 2016. Comparison of collagen and gelatin extracted from the skins of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) and channel catfish (*Ictalurus punctatus*). **Food Bioscience**, 13: 41-48. <http://dx.doi.org/10.1016/j.fbio.2015.12.005>.
- Zhong, M.; Chen, T.; Hu, C.; Ren, C. 2015. Isolation and Characterization of Collagen from the Body Wall of Sea Cucumber *Stichopus monotuberculatus*. **Journal Of Food Science**, 80(4): 671-679. <http://dx.doi.org/10.1111/1750-3841.12826>.
- Zhou, C.; Li, Y.; Yu, X.; Yang, H.; Ma, H.; Yagoub, A. E.A.; Cheng, Y.; Hu, J.; Otu, P. N.Y. 2016. Extraction and characterization of chicken feet soluble collagen. **Lwt**, 74: 145-153. <http://dx.doi.org/10.1016/j.lwt.2016.07.024.7>
- Zhuang, Y.L.; Sun, L.P.; Zhao, X.; Hou, H.; Ba- Fang, L. 2010. Investigation of Gelatin Polypeptides of Jellyfish (*Rhopilema esculentum*) for Their Antioxidant Activity in vitro. **Food Technol. Biotechnol.** 48 (2) 222–228.
- Zhuang, Y.L.; Zhao, X.; Li, B. 2009. Optimization of antioxidant activity by response surface methodology in hydrolysates of jellyfish (*Rhopilema esculentum*) umbrella collagen. **Journal Of Zhejiang University Science B**, 10(8): 572-579. <http://dx.doi.org/10.1631/jzus.b0920081>.
- Zhuang, Y.; Sun, L.; Zhang, Y.; Liu, G.; 2012. Antihypertensive Effect of Long-Term Oral Administration of Jellyfish (***Rhopilema esculentum***) Collagen Peptides on Renovascular Hypertension. **Mar Drugs**. 10(2): 417–426. doi: 10.3390/md10020417

CAPÍTULO II

PRODUÇÃO DE HIDROLISADO DE COLÁGENO DA ÁGUA-VIVA *Rhacostoma atlanticum*, OCORRENTE NA FAUNA ACOMPANHANTE DA PESCA

Manuscrito à ser submetido na Revista *Chemistry & Biodiversity* (Interdisciplinar B1)

PRODUÇÃO DE HIDROLISADO DE COLÁGENO DA ÁGUA-VIVA *Rhacostoma atlanticum*, OCORRENTE NA FAUNA ACOMPANHANTE DA PESCA

BAZI, C. C.¹ ; RESGALLA Jr., C. ¹& PESSATTI, M. L.¹.

¹Escola do Mar, Ciência e Tecnologia - Universidade do Vale do Itajaí – Itajaí, Santa Catarina, Brasil

1. RESUMO

O colágeno extraído de águas-vivas tem estrutura semelhante aos colágenos encontrados em diversos tecidos de vertebrados, podendo ser utilizados em cosméticos, na alimentação e para fins terapêuticos. Neste trabalho, foram desenvolvidos dois protocolos, um de produção de hidrolisado proteico da medusa *Rhacostoma atlanticum* sob alta temperatura e pressão, e outro de extração do colágeno solúvel em ácido (ASC) e precipitado com NaCl 0,9 M, 2 M e etanol. Estes precipitados foram, em separado, submetidos à hidrólise com pepsina, gerando a respectiva fração solúvel em pepsina (PSC). A aplicação da alta pressão e temperatura propiciou a produção de um hidrolisado parcial, como verificado pela distribuição de pesos moleculares por SDS-PAGE. A extração e precipitação com NaCl 0,9 M e 2 M renderam 43,5% e 53,6% em relação a matéria seca e 16,2% para o colágeno precipitado com 3 volumes de etanol. Já nos colágenos solúveis em pepsina, foi possível observar a presença de bandas representativas das cadeias $\alpha 2$ do colágeno tipo I. Para todas as amostras foi possível observar picos de absorção de infravermelho indicando a presença de estruturas presentes nas cadeias de colágeno, como anéis pirrolidínicos e amidas I, II e III. Para a análise de antioxidantes realizada no hidrolisado proteico, foi determinada atividade de captura do radical ABTS⁺ em diferentes tempos, e em tempos maiores de reação (36 minutos) foi possível observar maior atividade antioxidante. A presença de compostos *phenolic-like*, provavelmente gerados durante o processo de hidrólise, reforçam o potencial antioxidante do hidrolisado, que precisam ser confirmados por outras metodologias e por ensaios *in vivo*, a fim de avaliar a atuação destes antioxidantes em sistemas biológicos.

Palavras-chave: colágeno, *bycatch*, medusas, atividade antioxidante, hidrolisado.

2. ABSTRACT

Collagen extracted from jellyfish has a structure similar to the collagen found in some tissues of vertebrates, and can be used in cosmetics, food and for therapeutic purposes. In this work, protocols were developed, one of which is a protein hydrolyzate production of *Rhacostoma atlanticum* jellyfish under high temperature and pressure, and another one with the extraction of collagen in acid (ASC) and precipitated with 0.9 M NaCl, 2 M and ethanol. These precipitates were separately submitted to hydrolysis with pepsin, generating the respective pepsin soluble fraction (PSC). Extraction and precipitation with 0.9 M and 2 M NaCl yielded 43.5% and 53.6% in relation to the dry matter and 16.2% for the precipitated collagen with 3 volumes of ethanol. The application of the high pressure and temperature allowed the production of a partial hydrolyzate, as verified by the molecular weight distribution, by SDS-PAGE. In the pepsin-soluble collagens, it was possible to observe the presence of representative bands of type I collagen $\alpha 2$ chains. For all the samples it was possible to observe infrared absorption peaks indicating the presence of structures present in the collagen chains, such as pyrrolidine rings and amide I, II and II. For the analysis of antioxidants carried out in the protein hydrolyzate, the activity of capture of the ABTS⁺ radical at different times was determined, and in larger reaction times (36 minutes) it was possible to observe higher antioxidant activity. The presence of phenolic compounds, probably generated during the hydrolysis process, reinforces the antioxidant potential of the hydrolyzate, which must be confirmed by other methodologies and by in vivo assays in order to evaluate the performance of these antioxidants in biological systems.

Key words: collagen, bycath, jellyfish, antioxidant activity, hydroysate.

3. INTRODUÇÃO

O desenvolvimento de técnicas que visam o aproveitamento dos organismos capturados de forma não intencional na pesca vem gerando interesse devido às potencialidades de aproveitamento, como fonte de renda e de alimento complementar (BHAGWAT & DANDGE, 2018). Dentre as espécies encontradas no *bycath*, as de macromedusas chamam a atenção, levando em consideração o aumento da densidade

desses organismos em certas épocas do ano e o descarte de grandes quantidades desse recurso, uma vez que não há utilidade para a indústria pesqueira (MILLS, 2001; PURCEL, 2007).

Por outro lado, o aumento das populações de medusas no mundo e sua interferência nas atividades de pesca (BASTIAN et al. 2010) e turismo, tem estimulado a investigação do potencial de utilidade destes organismos tanto como fármacos quanto como suplementos alimentares (HSIEH & RUDLOE, 1994). Por possuírem características semelhantes às encontradas em mamíferos, biomoléculas com diversas atividades biológicas relevantes para a saúde humana têm sido investigadas (SUGAHARA et al. 2006; ZHUANG et al. 2012; HOYER et al. 2013).

O colágeno é a proteína predominante nos tecidos animais, exercendo diversas funções, dependendo do local onde se encontra (SCHMIDT et al. 2016). Pelo menos 27 tipos de colágeno já foram descritos, denominados tipos I a XXVII (GÓMEZ-GUILLÉN et al. 2011). O interesse atual pelo colágeno se difundiu entre os cientistas que investigam suas funções na área médica como na cicatrização de feridas, neoplasias, crescimento e diferenciação celular (HSIEH e RUDLOE, 1994) e também na área alimentícia, tendo em vista a potencial utilização na suplementação alimentar (SUGAHARA et al. 2006; GÓMEZ-GUILLÉN et al. 2011). Segundo Gómez-Guillén et al. (2011), a maioria das pesquisas direcionadas a extração de gelatinas, a partir de colágeno, na indústria, estão voltados para pele de suíno (cerca de 46%), couro bovino (29,4%), ossos de bovinos e suínos (23,1%) e as gelatinas provindas de peixes somaram 1,5% do total da produção de gelatinas, no ano de 2007.

A literatura científica sobre matérias-primas alternativas e novas funcionalidades do colágeno cresceu nos últimos 15 anos. Em parte, devido ao crescente interesse na valorização econômica dos subprodutos industriais (a partir da indústria de peixe), da gestão de resíduos industriais e pela procura de condições de processamento inovadoras, bem como potenciais novas aplicações (GOMÉZ-GUILLÉN et al. 2011). Mas também por questões religiosas e por causa de doenças que podem ser transmitidas por mamíferos, como a encefalopatia espongiforme bovina (EEB), encefalopatia espongiforme transmissível (EET) e febre aftosa (KITTIHATTANABAWON et al., 2010; SCHIMIDT et al., 2016; ZHANG et al., 2016).

As medusas integram um grupo de organismos que impacta banhistas, mergulhadores e pescadores, por causarem acidentes por envenenamento, principalmente no verão (RESGALLA JR et al. 2005; PURCELL et al. 2007). Por outro

lado, também é reconhecida sua contribuição ecológica, tanto para as cadeias tróficas quanto para o ciclo do carbono nos oceanos, pois apresenta importante contribuição na ciclagem de nutrientes após a sua morte e decomposição (GRAHAM et al. 2014). As proteínas estruturais, entre elas o colágeno, representam cerca de 60% da composição proteica desses organismos (NAGAI et al. 1999). O colágeno extraído de águas-vivas tem sua estrutura semelhante aos colágenos encontrados em vertebrados, podendo ser utilizados em cosméticos, na alimentação e com fins terapêuticos (HSIEH e RUDLOE, 1994). Segundo Kimura & Miura (1983) e Hsieh & Rudloe (1994), os colágenos encontrados nesses organismos são formados principalmente pelos aminoácidos glicina, hidroxiprolina e hidroxilisina, componentes essenciais na construção de tecidos celulares, cartilagens, ossos e dentes (HSIEH & RUDLOE, 1994). Dentre as espécies das quais essas proteínas já foram extraídas, isoladas e caracterizadas, estão: *Stomolophus nomurai* por Miura & Kimura (1985), *Rhopilema asamushi* por Nagai et al. (2000) e *Rhizostoma pulmo* por Addad et al. (2011).

A atividade biológica dessas proteínas e seus peptídeos contra problemas de saúde como, artrites, hipertensão e dores nas costas foram constatadas por diversos autores, como aludido por Felician et al. (2018). A utilização do colágeno no desenvolvimento de tecidos e na regeneração cartilaginosa foi investigado por Hoyer et al. (2013). Ding et al. (2011) demonstraram, em camundongos, os efeitos do colágeno hidrolisado de medusas contra a fadiga e a oxidação. Sugahara et al. (2006), Nishimoto et al. (2008) e Morishige et al. (2011) relataram os benefícios de colágeno hidrolisado de medusas na imunoestimulação.

Recentemente, pesquisadores investigaram a atividade antioxidante dos peptídeos que formam o colágeno de águas-vivas, como alternativa aos antioxidantes produzidos de forma sintética, já existentes no mercado, utilizados para suplementos e na indústria alimentícia (CAROCHO et al. 2018). Em testes *in vivo*, foi possível observar o efeito desses peptídeos na estimulação de produção de anticorpos IgM e IgG em células humanas (DAIFUKU et al. 2011). O uso de peptídeos de colágeno de medusas na redução da pressão sanguínea em animais (ZHUANG et al. 2012) e na produção de tecido cartilaginoso, visando a regeneração da matriz cartilaginosa (HOYER et al. 2013) também foram investigados. GÓMEZ-GUILLÉN et al. (2011) sugerem a utilização do colágeno de águas-vivas como alternativa aos já utilizados pela indústria, a maioria de origem bovina ou suína.

Sendo assim, a partir dos registros de maior ocorrência da espécie *Rhacostoma atlanticum* em nosso litoral, principalmente nos meses de verão, esta matéria prima foi investigada como fonte de peptídeos de interesse nutricional. Com maior frequência de captura na pesca de arrasto do camarão, esta espécie tem ocorrência no sul e sudeste do Brasil (MORANDINI 2005; SCHOEREDER *et al.* 2014; BARBA *et al.* 2016) e é conhecida pela presença de tentáculos pequenos e frágeis, que são facilmente removidos, e com baixa toxicidade de envenenamento, o que facilita o manuseio e acelera o seu processamento.

Desta forma, este estudo teve como objetivo avaliar e comparar as características físico-químicas do colágeno da água viva de *Rhacostoma atlanticum*, extraído em sua forma nativa e do seu hidrolisado proteico bruto, a fim de avaliar a eficácia do procedimento de hidrólise, a eficiência na produção e a atividade antioxidante dessas proteínas hidrolisadas.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Obtenção da matéria prima

Os espécimes foram adquiridos através de arrastos realizados na região costeira, capturados de forma não intencional, na pesca de arrasto de camarão, realizados por embarcação motorizada operando na modalidade arrasto de popa, com uma duração de 10 minutos. As macromedusas obtidas nos arrastos foram ensacadas a bordo, mantidas em caixa de isopor refrigerada, e então transportadas para o laboratório, onde os organismos foram lavados em água de torneira, congelados e mantidos à -20° C, mantidos até posterior utilização.

4.2 Extração do colágeno íntegro à frio (ASC)

O colágeno em sua forma nativa foi obtido conforme Zhang *et al.* (2014), com algumas modificações. Pedacos de água-viva de aproximadamente 2 cm, cortados com tesoura foram submetidos à extração do colágeno com ácido acético 0,6 M por 3 dias em agitação, em incubadora à 1° C. O extrato foi homogeneizado em liquidificar e, então, mantido por mais 24 h em geladeira. O colágeno presente no extrato foi precipitado por *salting-out* com NaCl em duas concentrações diferentes (0,9 M e 2 M) ou com etanol absoluto 3 volumes. O precipitado resultante foi recolhido por centrifugação (16421 x g durante 60 min.). Os precipitados com NaCl foram dialisados contra água, congelados (-20° C) e liofilizados. Os precipitados com etanol 3 volumes

foram lavados com água destilada e então liofilizados. Essas amostras foram denominadas colágeno solúvel em ácido (ASC) (Figura 1).

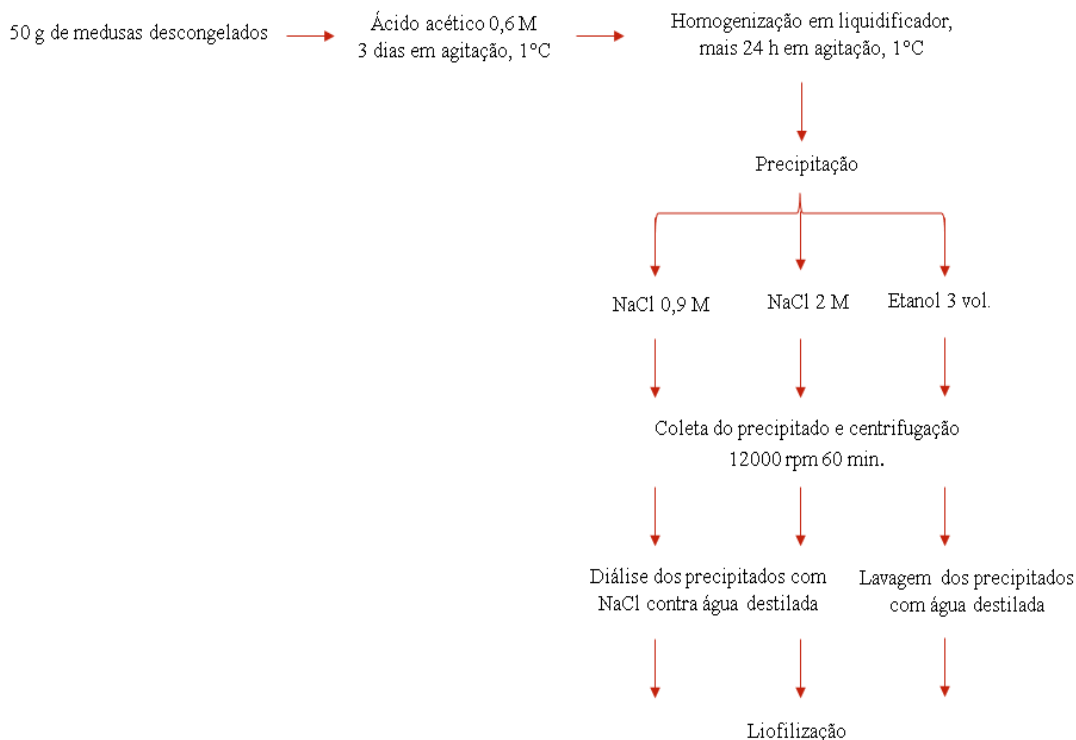


Figura 1 - Desenho esquemático do procedimento de obtenção do colágeno solúvel em ácido (ASC).

4.3 Produção do colágeno solúvel em pepsina (PSC)

O colágeno íntegro seco de cada tratamento de precipitação foi incubado com pepsina (10 mg de pepsina/ 1 g de amostra seca), e ácido acético 0,5 M. A pepsina foi solubilizada em 5 volumes (em relação ao volume da amostra seca) de ácido acético e incubada à 4° C sob agitação por 24 horas. Em seguida, a amostra foi centrifugada a 12.000 rpm por 1 hora. O pH do sobrenadante foi neutralizado com NaOH 2 N até pH 7 e mantido na geladeira por 12 horas. Depois deste período a amostra foi centrifugada à 16421 x g por 45 minutos e o sobrenadante foi dialisado *overnight* contra 50 volumes de fosfato monoácido de sódio 0,02 M, pH 9,0. O dialisado, contendo o precipitado tipo-algodão foi obtido por centrifugação à 16421 x g por 35 min, congelado (- 20° C) e liofilizado. Esta amostra foi chamada de colágeno solúvel em pepsina (PSC).

4.4 Produção do hidrolisado proteico de medusas (HP) por meio físico-químico

Na intenção de se obter o hidrolisado bruto (HP), as medusas foram cortadas em pequenos pedaços e imersas em água destilada (1:1, v:v) e hidrolisadas à 122° C e 1,2 atm, por 30 min. Após esse período a amostra foi filtrada, congelada e liofilizada.

4.5 Caracterização bioquímica

4.5.1 Determinação de proteínas solúveis

Para a determinação do teor de proteínas solúveis foi utilizado o método de Lowry *et al.* (1951), modificado por Petterson (1977). A leitura foi em 750 nm e o BSA utilizado como padrão.

4.5.2 Eletroforese SDS-PAGE

Para se determinar o perfil de peso molecular das amostras foi realizada eletroforese em gel de poliacrilamida em condições desnaturantes, conforme descrito por Laemmli *et al.* (1970). As amostras foram diluídas a 6 mg/ml; as amostras de colágeno íntegro foram diluídas em NaOH 0,5 M e as amostras de colágeno solúvel em pepsina e do hidrolisado bruto foram solubilizados em água destilada. Todas foram aquecidas a 85° C por 5 minutos e, após total solubilização, foi acrescentado o tampão de amostras (1:1, v:v) (glicerol 11%, SDS 2,2%, Tris-HCl pH 6,8 0,5 M, água destilada, DTT 10%), aquecidas por mais 5 minutos a 85 °C e aplicadas no gel. Como referência foi utilizado padrão de proteínas de alto peso molecular (GE Healthcare -17-0615-01). Para as análises de composição de pesos moleculares dos peptídeos gerados pelo processo de hidrólise, foi realizada eletroforese em gel de poliacrilamida em condições desnaturantes para peptídeos, conforme Schägger (2006). Foram adicionadas 50 µg de amostra em 5 µl de tampão de amostra, aquecidas a 37° C por 20 min. e aplicadas no gel. Como referência foi usado padrão de proteínas de baixo peso molecular (Amersham Biosciences – 17-0446-01). Para ambas as técnicas, após a corrida, o gel foi fixado e corado com Coomassie Brilliant Blue, conforme Laemmli *et al.* (1970).

4.5.3 Espectroscopia em infravermelho

Para confirmar a presença dos íons moleculares correspondentes aos aminoácidos do colágeno foi utilizada a espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier (FTIR). A análise de FTIR foi realizada em espectrômetro Shimadzu IRAffinity-1S, utilizando aproximadamente 3 mg de proteína (colágeno) diluídas em NaOH 0,05 M, e acrescentado aproximadamente 100 mg de brometo de potássio (KBr) e seco em estufa a 45 °C. A amostra em pó foi utilizada para a leitura dos espectros na região de 4000 a 400 cm^{-1} .

4.6 Caracterização bioquímica do hidrolisado proteico

O colágeno parcialmente hidrolisado foi caracterizado em termos de dosagem de proteínas, SDS-PAGE e FTIR, conforme descrito anteriormente, além dos itens a seguir.

4.6.1 Capacidade de absorção de água e de óleo

A capacidade de absorção de água foi determinada conforme Wang et al. (2009) e Martins et al. (2009), com modificações. Para medir a capacidade de retenção de água e a capacidade de ligação de gordura, 15 mL^{-1} de água destilada ou 15 mL^{-1} de óleo de soja foram adicionados, respectivamente, 0,05 g. de hidrolisado e mantidos à temperatura ambiente durante 1 h. As soluções foram misturadas em vórtex por 10 segundos a cada 15 minutos. As soluções foram então centrifugadas (11404 x g) durante 35 minutos. O sobrenadante foi desprezado e o tubo drenado durante 30 minutos em papel de filtro, com inclinação de 45°. As capacidades de retenção foram calculadas com o peso do conteúdo do tubo após drenagem dividido pelo peso do resíduo da amostra seca e expressa em ml de água ou óleo por g de matéria seca.

4.6.2 Atividade antioxidante

A atividade antioxidante *in vitro* das amostras de hidrolisado proteico foi mensurada pelos métodos de DPPH, ABTS e como estimativa indireta, o teor de compostos fenólicos.

4.6.2.1 Radical DPPH

A determinação da atividade antioxidante pela captura do radical livre DPPH foi realizado segundo Centenaro et al. (2011). O ácido gálico foi utilizado como padrão. As absorbâncias foram realizadas a 517 nm e o percentual da atividade antioxidante foi expresso segundo a seguinte equação:

$$(\% \text{ atividade DPPH}) = \frac{\text{Abs. controle} - \text{Abs. da amostra}}{\text{Abs. do controle}} \times 100$$

4.6.2.2 Radical ABTS

Para o método ABTS (método da captura do radical ABTS), o ácido ascórbico foi utilizado como padrão (CENTENARO et al, 2011). As absorbâncias das soluções com as amostras (1 e 6 mg/mL⁻¹) foram determinadas à 734 nm, intercaladas por um período de 66 minutos. A atividade de *scavenger* sobre o radical ABTS⁺ das amostras foi expressa como equivalentes de ácido ascórbico µM (AAE) por mg de amostra em 6 minutos.

4.6.2.3 Compostos fenólicos

A quantificação dos fenólicos totais foi determinada pelo método Folin-Ciocalteau (ANAGNOSTOPOULOU et al., 2006) utilizando o ácido gálico como padrão e em uma alíquota de 0,5 mL de amostra de PSC na concentração de 6 mg/mL e dos hidrolisados proteico bruto (HB) em concentrações entre 3 e 200 mg/mL. As soluções tiveram suas absorbâncias medidas 1 h. depois a 725 nm. Todas as análises foram realizadas em triplicatas. Os resultados foram expressos em mg de ácido gálico por g de extrato ou fração (matéria seca).

5. RESULTADOS

5.1 Extração dos colágenos íntegros

Os rendimentos das extrações de colágeno íntegro da medusa *R. atlanticum*, em relação a matéria prima inicial seca (MPS) e úmida (MPU) foram apresentados na Tabela 1. A precipitação realizada com cloreto de sódio foi mais trabalhosa, devido a necessidade de diálise para a retirada do excesso de sal no material precipitado. Esta etapa adicional aumentou o tempo de produção do material final. Foi possível observar

também que a precipitação com as duas concentrações de NaCl, apesar de serem mais rápidas, apresentaram acúmulo de cristais de sal no interior da massa precipitada. Já na precipitação realizada com etanol foi observada que a medida que se aumentava o volume de etanol, mais material era precipitado. Em função disto, as demais análises realizadas neste trabalho foram em base do precipitado obtido por este último método.

Tabela 1- Rendimentos das extrações do colágeno nativo, para os diferentes tratamentos de precipitação, e hidrolisado proteico. Matéria prima inicial seca (MPS) e matéria prima inicial úmida (MPU).

Amostra ASC	Rendimento (%)	
	MPS	MPU
ASC NaCl 0,9 M	43,5	4,5
ASC NaCl 2 M	53,6	5,5
ASC Etanol 3 vol.	16,2	5,6

O tempo de duração de cada protocolo foi de em torno de 10 dias, desde o início do processo até o final da liofilização. O colágeno íntegro de *R. atlanticum* não apresentou completa solubilidade em ácido como o descrito na literatura (DING et al. 2011; ZHANG et al. 2014; CHENG et al. 2016). No entanto, apresentou melhor solubilidade em meio básico (pH 9) e solubilidade completa após aquecimento em banho maria por 5 minutos entre 85 e 95° C.

5.2 Produção do colágeno solúvel em pepsina (PSC)

A fração do colágeno bruto solúvel em pepsina foi obtida por hidrólise enzimática da amostra de colágeno em ácido (ASC) com pepsina. A duração do protocolo de tratamento enzimático foi de aproximadamente 24 h (incluindo o tempo de liofilização). Os rendimentos foram analisados tanto em relação à massa seca do ASC, quanto em relação à massa seca da matéria prima inicial (MPS) (Tabela 2).

Tabela 2- Rendimentos das amostras de colágeno solúvel em pepsina (PSC) em relação ao colágeno solúvel em ácido (ASC) e em relação a matéria prima inicial seca (MPS).

Amostra	ASC (%)	MPS (%)
NaCl 0,9M	6,33	1,23
NaCl 2M	8,91	1,77
Etanol 3 v.	6,21	0,85

5.3 Produção do Hidrolisado Proteico de medusas (HP)

O rendimento da amostra em relação à matéria seca foi de 66,8 % e em relação a matéria inicial úmida foi de 6,9%.

5.4 Teor de Proteínas solúveis

O teor de proteínas solúveis do hidrolisado proteico foi de 0,039 mg/mL, sendo esse resultado maior que os registrados para PSC extraído com NaCl 0,9 M, NaCl 2M e etanol 3 volumes, que apresentaram 0,01 mg/ml 0,02 mg/ml e 0,01 mg/ml, respectivamente.

5.5 Eletroforese SDS-PAGE

A eletroforese de alto peso molecular foi realizada de acordo com o protocolo proposto por Laemmli (1970) e teve como objetivo a determinação da distribuição de peso molecular das cadeias peptídicas presentes nas amostras, tanto de colágeno íntegro solúvel em pepsina (PSC) quando para o hidrolisado bruto (HB). Com este procedimento foi possível visualizar a presença das bandas α_2 (116 kDa) e β (> de 200 kDa) (Figura 2), características do colágeno tipo I, bem como a efetividade do processo de produção do PSC. Também foi possível observar o efeito de alta temperatura e pressão sobre o perfil do hidrolisado proteico bruto (Figura 3). A ausência de bandas definidas sugere a existência de proteínas de diferentes pesos moleculares na amostra, indicativo de hidrólise parcial da amostra.

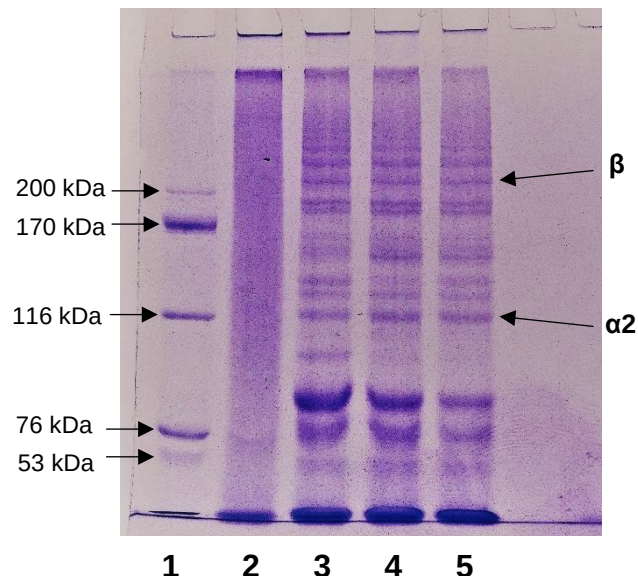


Figura 2- SDS-PAGE de proteínas das amostras de hidrolisado proteico bruto e de colágeno solúvel em pepsina (PSC). Amostras (6 mg/ml) aplicadas em *stacking* 4%, resolvidas em gel de poliacrilamida 7,5% e reveladas com Coomassie Brilliant Blue. (1) Padrão, (2) Hidrolisado Bruto, (3) PSC extraído com 0,9 M de NaCl, (4) PSC extraído com 2 M de NaCl e (5) etanol 3 volumes.

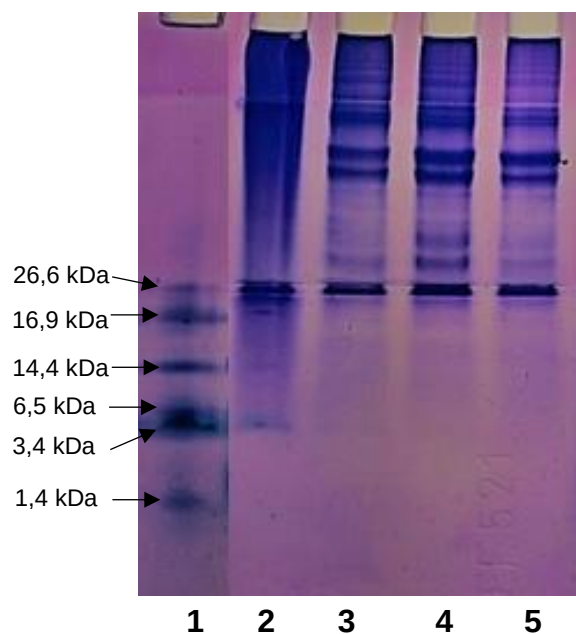


Figura 3- SDS-PAGE de proteínas e peptídeos das amostras de hidrolisado proteico bruto e de colágeno solúvel em pepsina (PSC). Amostras aplicadas em *stacking* 4%, resolvidas em gel de poliacrilamida 10 e 16% e reveladas com Coomassie Brilliant Blue. (1) Padrão BioRad, (2) Hidrolisado Bruto, (3) PSC extraído com 0,9 M de NaCl, (4) PSC extraído com 2 M de NaCl e (5) etanol 3 volumes.

5.6 Espectrometria em Infravermelho com Transformada de Fourier

Para confirmar a presença dos íons moleculares correspondentes aos aminoácidos do colágeno foi utilizada a espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier (FTIR). Através das transmitâncias obtidas foi possível observar a presença de picos nas regiões do espectro da absorção principalmente nas regiões entre 1.350 e 1800 cm^{-1} e entre 3.600 e 2.700 cm^{-1} para a amostra ASC para os três diferentes tratamentos de precipitação (Figura). As transmitâncias para as amostras PSC para os três tratamentos apresentaram mais regiões de picos de absorção quando comparadas com as amostras ASC (Figura). Os picos foram verificados entre 1.700 e 900 cm^{-1} e entre 2.100 e 3.600 cm^{-1} .

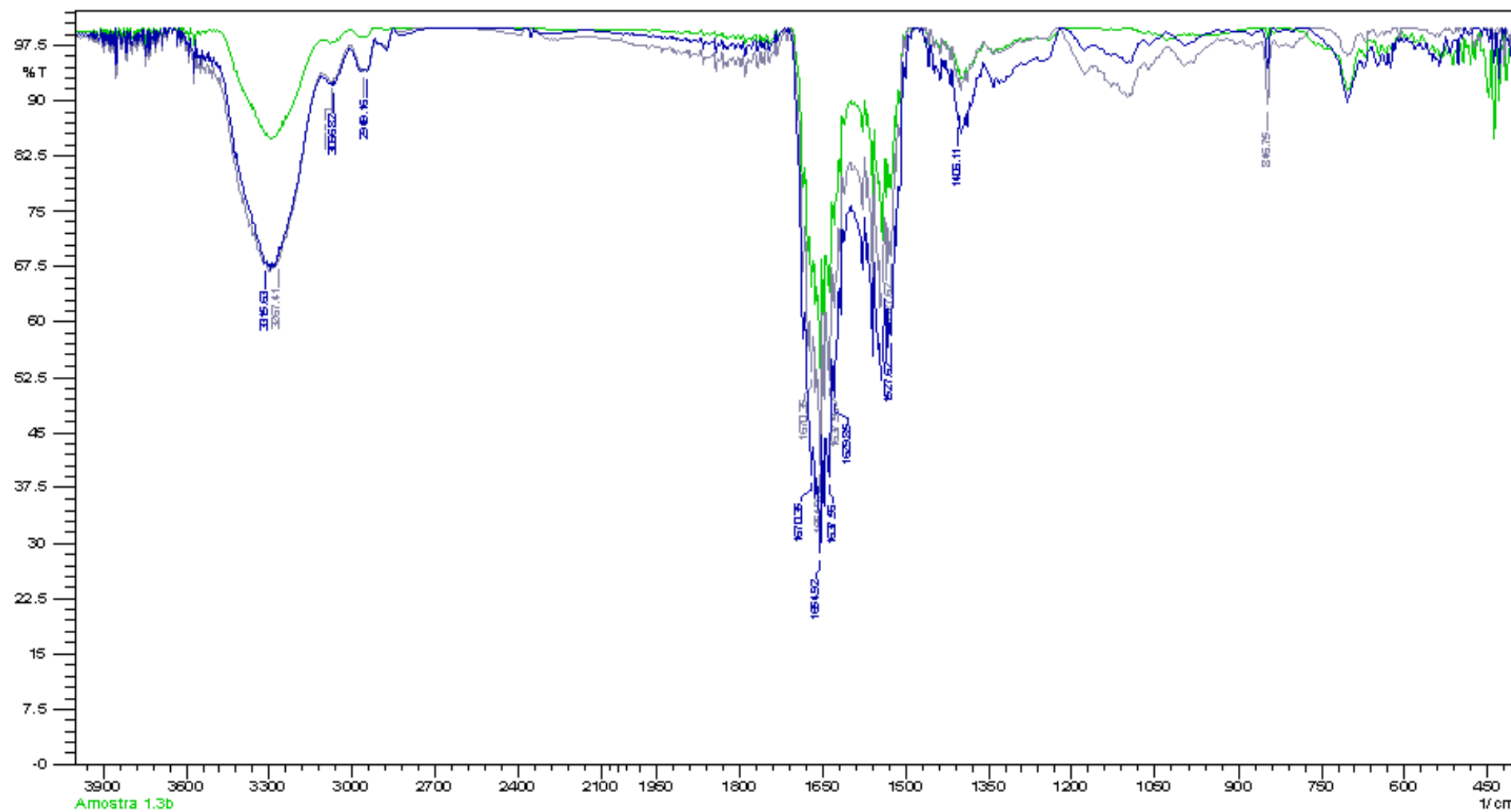


Figura 4- Espectro de transmitância da análise de FTIR entre as amostras ASC para os diferentes tratamentos de precipitação (Azul: ASC extraído com NaCl 0,9 M. Cinza: ASC extraído com NaCl 2 M. Verde: ASC extraído com etanol 3 volumes).

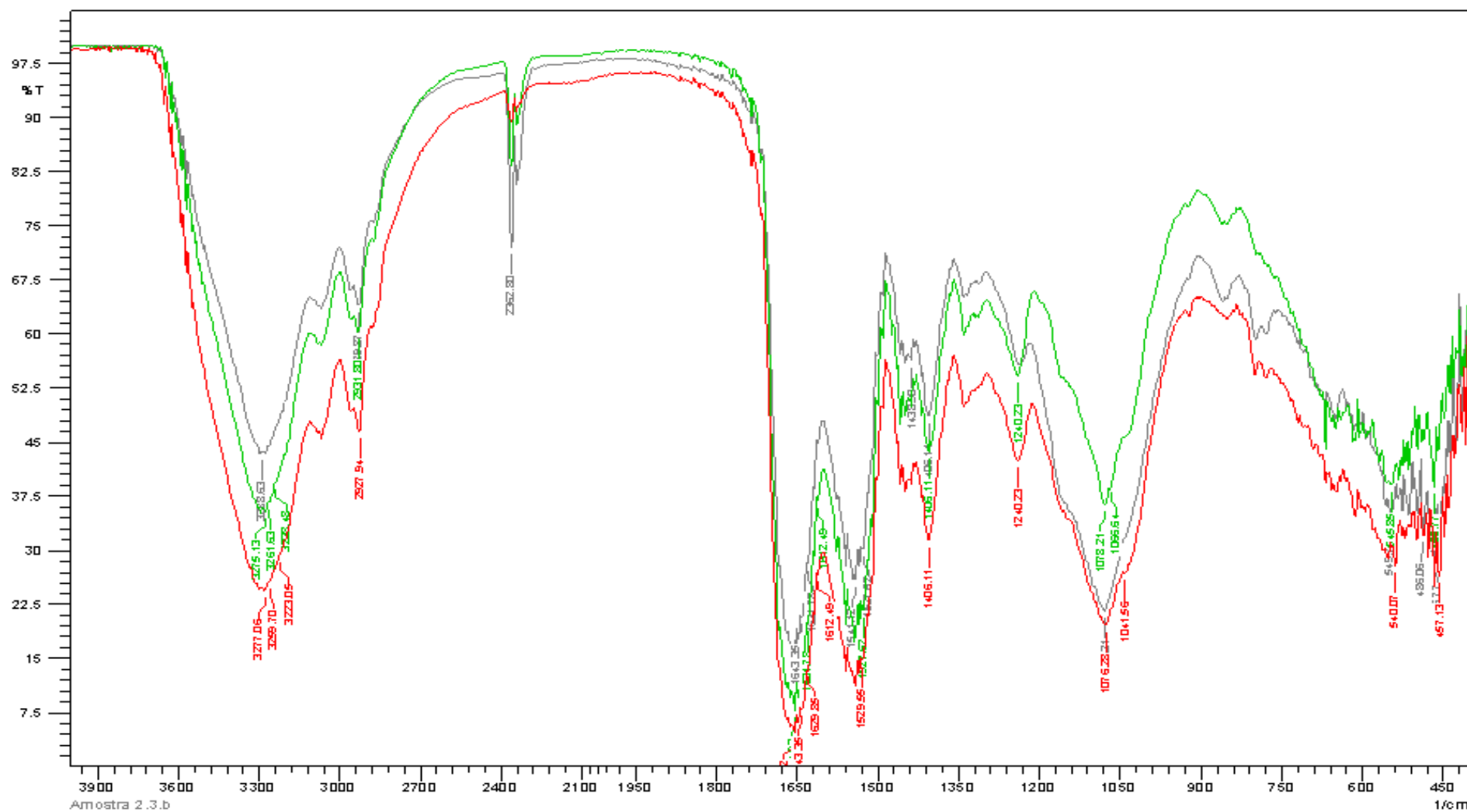
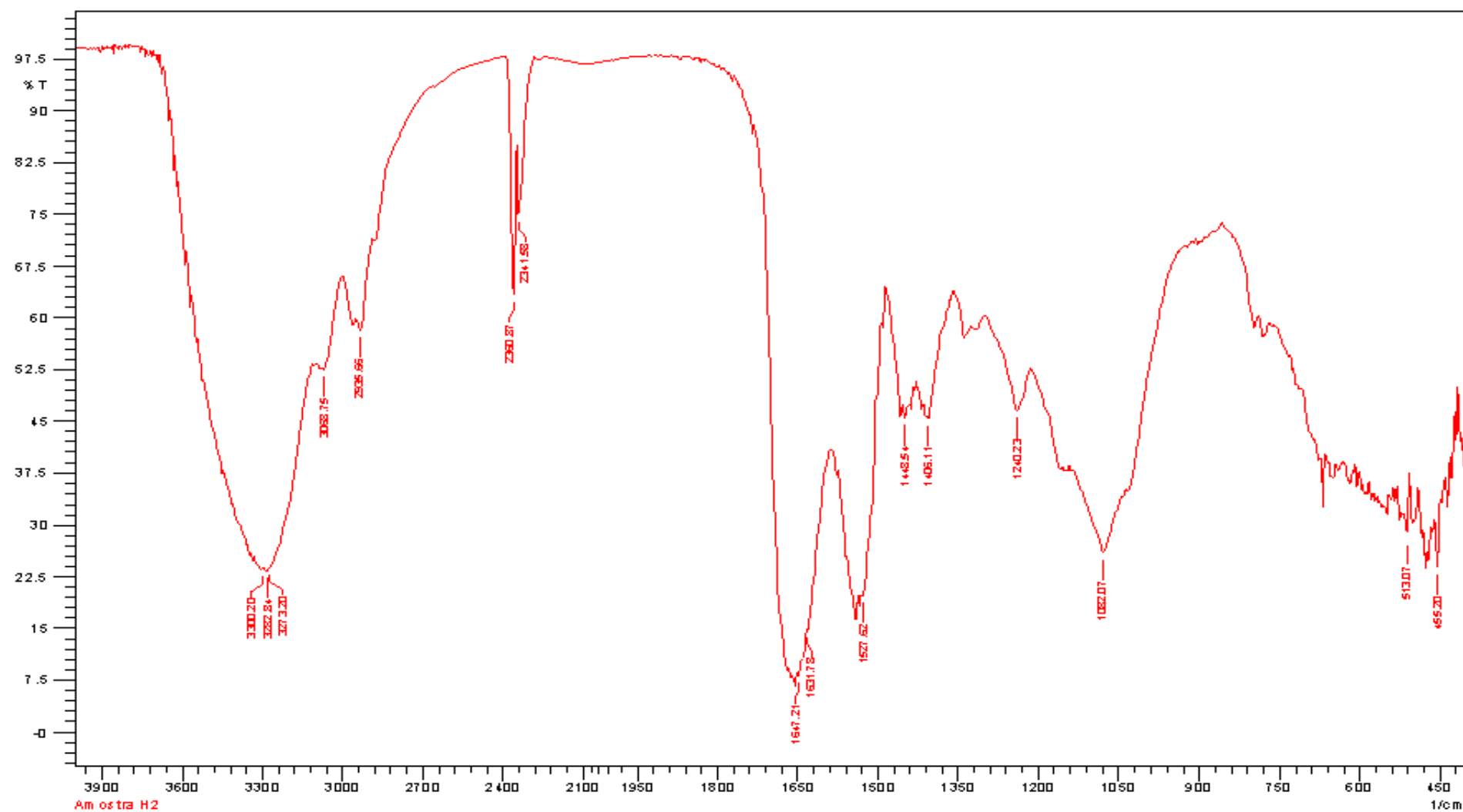


Figura 5- Espectro de transmitância da análise de FTIR entre as amostras PSC para os diferentes tratamentos de precipitação (Vermelho: PSC extraído com NaCl 0,9 M. Verde: PSC extraído com NaCl 2 M. Cinza: PSC extraído com etanol 3 volumes).

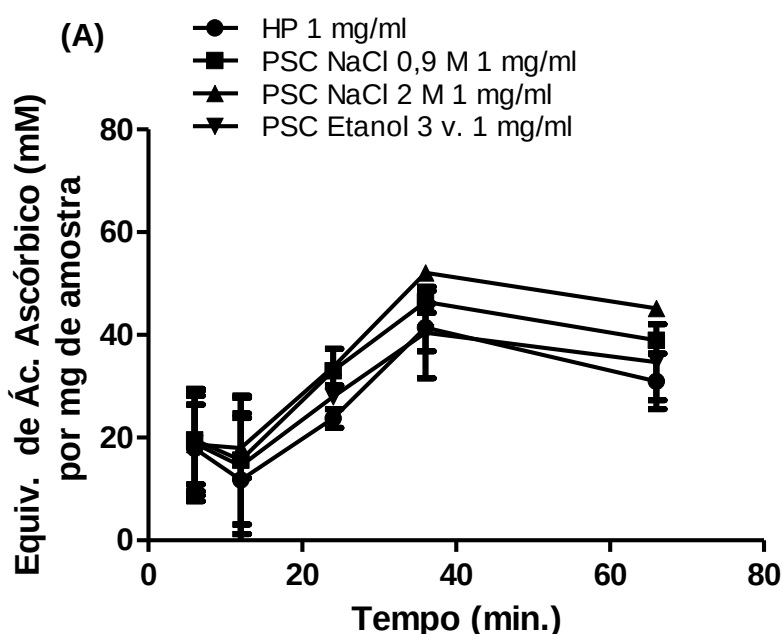


Amostra H2
Figura 6- Espectro de transmitância em FTIR da amostra do hidrolisado proteico.

5.7 Atividade antioxidante

Para a atividade antioxidante determinada pela captura do radical de DPPH, a interferência da opacidade apresentada pela amostra quando em contato com o reativo de DPPH (em etanol), impossibilitou a mensuração correta dos dados. Já os resultados para a atividade de ABTS foram relativizados à curva de calibração de ácido ascórbico com tempo de reação de 6 minutos (**Erro! Fonte de referência não encontrada.**). Para as amostras nas concentrações de 1 e 6 mg/mL, dentro de um intervalo de 66 minutos, foi possível constatar um aumento na atividade antioxidante com o aumento da concentração de amostra, bem como o pico de atividade em aproximadamente 40 minutos de reação para as duas concentrações (**Erro! Fonte de referência não encontrada.** A e B).

A análise de compostos fenólicos (*phenolic-like*) para o hidrolisado bruto, indicou o aumento destes compostos de acordo com o aumento da concentração da amostra, indicando o efeito dose:resposta da amostra. No entanto, não se observou esse resultado nas frações PSC (colágeno solúvel em pepsina) obtidas pelos diferentes tratamentos de precipitação na concentração de 1 mg/mL. E na concentração de 6 mg/mL, apenas quantidades traços foram verificadas. Este resultado indicou que pode ter havido a geração destes compostos fenólicos durante o processo de hidrólise em alta temperatura.



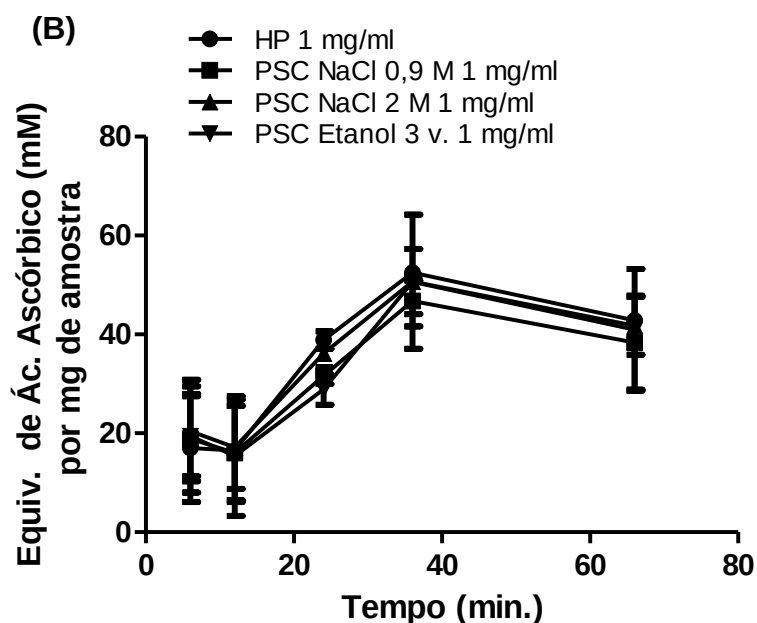


Figura 7- Atividade antioxidante mensurada pela captura do radical ABTS⁺. (A) Amostras de hidrolisado bruto proteico 1mg/ml e (B) 6mg/ml.

Tabela 3- Resultados da análise de compostos fenólicos. (a) Resultados do hidrolisado proteico em diferentes concentrações e (b) PSC nos diferentes tratamentos de precipitação na concentração de 6 mg/mL.

a)	Amostra HP (ml/ml)	mg de ácido gálico/g MPS
	200	176,59
	100	108,68
	50	58,57
	25	44,51
	6,25	17,88
	3,56	7,95
b)	Amostra (mg/ml)	mg de ácido gálico/g MPS
	PSC NaCl 0,9 M 6 mg/ml	3,226
	PSC NaCl 2 M 6 mg/ml	3,295
	PSC Etanol 3v. 6 mg/ml	3,851

6. DISCUSSÃO

A demanda por fontes alternativas de colágeno tem aumentado constantemente, tanto por preocupações com doenças que podem ser transmitidas pelos animais utilizados na obtenção do colágeno (suínos e bovinos) (ZHANG *et al.* 2014), como por motivos religiosos (KHONG *et al.* 2017).

Neste trabalho investigou-se a potencial utilização de macromedusas da espécie *Rhacostoma atlanticum* como matéria prima para extração de proteínas colagenosas. Com ocorrência na pesca de arrasto do camarão, esta espécie de macromedusa tem ocorrência em todo o sul e sudeste do Brasil (MORANDINI 2005; SCHOEREDER *et al.* 2014; BARBA *et al.* 2016) e suas densidades são mais elevadas principalmente nas estações da primavera e verão, quando a temperatura da água está mais elevada (BARBA *et al.* 2016). Esta espécie é conhecida pela presença de tentáculos pequenos e frágeis, que são facilmente removidos pelas redes quando capturadas. A baixa toxicidade do envenenamento causado por essa espécie é outro fator que faz com que a captura destes organismos pelos pescadores seja realizada de forma segura, uma vez que os acidentes, em sua maioria por outras espécies, ocorrem com frequência no manuseio dentro das embarcações e na limpeza das redes. Estudos voltados para a utilização desta espécie para consumo humano como alimento já foram realizados, investigando a viabilidade do processo de desidratação por salga (BAZI *et al.*, submetido), indicando uma potencial utilização deste animal. Além disso, em análises realizadas com organismos *in natura* desta espécie, De Borba *et al.* (2016) relataram valores de aproximadamente 10,6% para proteína bruta na matéria seca, indicando que *R. atlanticum* tem potencial como fonte de proteínas.

No entanto, uma das dificuldades na obtenção desses organismos é o armazenamento, pois tratam-se de organismos frágeis e suscetíveis a mudanças de temperatura fora do ambiente aquático. Dependendo da utilização desses organismos, o procedimento de armazenamento pode prejudicar os tecidos. O processo de congelamento acaba danificando partes do tecido do animal, não sendo favorável para a utilização dos organismos para o processamento e consumo humano (BAZI *et al.*, submetido), pois acaba interferindo no formato e apresentação do produto final. No ensaio de proteínas solúveis em amostras da água de descongelamento dos animais (dado não mostrado), foi possível observar a influência deste processo na retirada das proteínas solúveis presentes nos tecidos. Desse modo, o congelamento pode ser

utilizado como parte do processo de extração, uma vez que pode retirar proteínas solúveis da matriz, concentrando as proteínas colagenosas. Assim, o processo de congelamento pode substituir os passos iniciais da extração química, os quais visam a retirada dessas proteínas da matriz e são comumente realizados com hidróxido de sódio (SCHIMIDT *et al.*, 2016). Por isso, a utilização do congelamento para fins de obtenção de colágeno pode facilitar o processo de extração, uma vez que podem ser mantidas nas embarcações durante o período de pesca, com duração entre 20 e 30 dias.

Na indústria, durante a extração e purificação do colágeno, processos químicos são realizados, podendo levar algumas horas até dias para alcançar o produto final (SCHIMIDT *et al.* 2016; OLIVEIRA, 2017). Schimidt *et al.* (2016), em revisão sobre o assunto, elucidaram algumas das técnicas utilizadas para a extração e hidrólise do colágeno. Devido à natureza do colágeno encontrado no tecido conjuntivo dos animais, sua dissolução é lenta, mesmo em altas temperaturas. Por isso a utilização de um pré-tratamento químico suave é realizado, na intenção de hidrolisar as ligações covalentes das cadeias alfa que formam a fibra de colágeno (PRESTES, 2013). Além disso, auxilia a retirada de proteínas não colagenosas presentes nesses tecidos, além de impurezas e cálcio (OLIVEIRA, 2017). Em pele de peixe, o tratamento em meio ácido é normalmente suficiente para produzir aderência e para clivar ligações intra e inter-moleculares não covalentes, devido à labilidade ácida do colágeno reticulado (GOMÉZ-GUILLÉN & MONTERO, 2011).

Neste trabalho, foi realizada, de forma comparativa, uma extração do colágeno íntegro em meio ácido, chamado de colágeno solúvel em ácido (ASC), utilizando o protocolo desenvolvido por Chen e colaboradores (2016), com algumas modificações. O rendimento para o ASC para cada tratamento de precipitação para a *Rhacostoma atlanticum* foram de 43,5%, 53,6% e 16,2% para os tratamentos com NaCl 0,9M, 2 M e etanol 3 volumes, em relação a matéria seca inicial. Esses dados são comparáveis aos obtidos por Nagai *et al.* (2000) para a mesoglea de *Rhopilema asamushi* (35,2%), por Nagai *et al.* (1999) para a umbrela de *Stomolophus meleagris* (46%), por Krishnan & Perumal (2013) para a espécie *Chrysaora quinquecirrha* (0,48%) e por Zhang *et al.* (2014) para a umbrela de *Cyanea nozakii* (13,0%), sempre em relação ao peso seco das amostras. A precipitação com etanol teve rendimento inferior aos tratamentos com NaCl. No entanto, esses rendimentos podem ser aumentados, conforme o volume utilizado de etanol para a precipitação, até o limite testado de 5 volumes (dado não

mostrado). Em comparação ao tratamento com NaCl, a precipitação com etanol é de fácil remoção do colágeno, evitando a etapa de dialise, necessária para a retirada do cloreto de sódio da amostra.

Utilizando sonicação previamente a precipitação por NaCl, Khong e colaboradores (2017) obtiveram rendimento do colágeno extraído da umbrela de *Acromitus hardenbergi* de 37,08% e de 40,20% para braços orais, em relação ao peso seco. Os autores salientaram que as vibrações ultrassônicas se mostraram eficazes para romper a membrana celular, liberar o conteúdo das células e facilitar a remoção subsequente de colágeno da matriz extracelular dos tecidos de água-viva.

Após o processo de extração e precipitação, a obtenção do colágeno purificado é facilitada pela adição de enzimas proteolíticas, que clivam as regiões terminais das cadeias colagenosas, de acordo com a composição de aminoácidos que formam essas regiões. A enzima mais utilizada para esse processo é a pepsina, porém a papaína e a tripsina têm sido utilizadas e se mostrado eficientes (SILVA et al. 2014). Felician et al. (2018) assinalam a necessidade da utilização destas enzimas, principalmente para águas-vivas, uma vez que o alto teor de água nestes organismos dificulta a solubilidade em ácido, além das fortes ligações covalentes existentes nas regiões terminais da tripla hélice (telopeptídeos), as quais o tratamento em ácido não é capaz de hidrolisar por completo. Para a obtenção do colágeno solúvel em pepsina (PSC) o rendimento final em relação a matéria inicial seca foi de 1,23% para o colágeno extraído com 0,9 M de NaCl, 1,77% para o colágeno extraído em 2 M de NaCl e 0,85% para o colágeno extraído com 3 volumes de etanol. Esses dados são consideravelmente menores que os encontrados por Zhang *et al.* (2014), os quais obtiveram um rendimento aproximado de 5,5% de rendimento na matéria seca para a umbrela da *Cyanea nozakii*, mas semelhantes ao constatado por Krishnan & Perumal (2013), os quais obtiveram percentual de 2,1% para a espécie *Chrysaora quinquecirrha*.

Com relação a produção do hidrolisado proteico bruto, a temperatura (122 °C) e a pressão (122 MPa) tiveram atuação direta para que ocorresse hidrólise das proteínas. A matéria prima (medusas em pedaços) foi submetida à hidrólise em água. Esta opção foi adotada, tendo em vista que se o hidrolisado fosse produzido em ácido acético 0,1 M (testes preliminares), seria necessária a diálise antes da liofilização. Uma vez que o *cut off* da membrana de diálise usada neste trabalho era de 13 kDa, tal procedimento levaria a potencial perda de peptídeos e proteínas de baixo peso molecular. No entanto, em

nosso estudo, o grau de hidrólise ficou abaixo do comumente relatado, com pressões mais elevadas (>250 MPa) (GÓMEZ-GULLÉN & MONTERO, 2005; GÓMEZ-GUILLÉN et al. 2011; ZHANG et al. 2016; JASWIR et al. 2017; NAM et al. 2018). Por outro lado, em seus estudos sobre o efeito de alta pressão na extração de gelatinas de pele de peixe, Gómez-Guillén e Montero (2005) descreveram que as amostras que passaram por tratamento prévio com ácido fraco e água, por dez minutos em 250 MPa, apresentaram perfil eletroforético de moléculas com peso molecular menor de 100 kDa e sem a presença de dímeros ou trímeros, indicando um alto grau de solubilização do colágeno e até mesmo hidrólise. No entanto, as mesmas amostras quando expostas a maior pressão (400 MPa) apresentaram perfil com maior quantidade de polímeros de alto peso molecular, sugerindo um grau de agregação induzida pela pressão (GIMÉNEZ & MONTERO, 2005; GOMÉZ-GILLÉN et al. 2011).

A partir do perfil eletroforético de alto peso molecular (Fig.2), foi possível observar que o hidrolisado produzido possui peptídeos com diferentes pesos moleculares. Foram visualizadas moléculas tanto no topo do gel, indicando pesos moleculares superiores a 200 kDa, quanto no *front*, onde é observada a presença de moléculas de pesos moleculares inferiores a 20 kDa. A falta de resolução de bandas e o efeito de escorrimento no gel de SDS-PAGE indicam a hidrólise parcial desta amostra. No entanto, GIMÉNEZ & MONTERO (2005) salientam a relação do efeito de altas pressões sobre as cadeias de colágeno, contrapondo que o colágeno não sofre com os efeitos da alta pressão, dado que as ligações de hidrogênio são insensíveis à pressão. Em pressão relativamente baixa, eles podem parecer até mais reforçados, devido a pequena redução de volume associada. (GOMÉZ-GILLÉN et al. 2011).

O teste de capacidade de absorção de água e óleo foi realizado tanto para as amostras ASC, dos três tratamentos, quanto para a amostra do hidrolisado proteico. Através desta análise é possível elucidar os direcionamentos para a futura aplicação da amostra estudada e também avaliar o grau de integridade das cadeias do colágeno, uma vez que há uma relação entre a massa molecular, a capacidade de formação de rede proteica e a capacidade de retenção de água (ROMAN & SGARBIERI., 2005). Segundo Hou et al. (2012) e Huang et al. (2016), moléculas com alta capacidade de absorção e retenção de água possuem, proporcionalmente, maior quantidade de resíduos polares, o que lhes confere a habilidade de formar pontes de hidrogênio. Deste modo, essas proteínas possuem ampla utilização na cosmetologia, nutrição e medicina. No entanto, o

método de extração pode influenciar o comprimento das cadeias polipeptídicas e as propriedades funcionais do colágeno, tais como viscosidade, solubilidade, bem como retenção de água e capacidade de emulsificação (SCHIMIDT et al. 2016).

Dentre os tratamentos de precipitação do colágeno ASC de *R. atlanticum*, das amostras obtidas através da precipitação com cloreto de sódio, a concentração de 0,9 M foi a que apresentou o maior percentual de absorção de água (42 ml/g $\pm$ 7,7 em relação a matéria seca), seguido do tratamento com cloreto de sódio 2 M (37 ml/g $\pm$ 2,6 em relação a matéria seca) e, por fim, com etanol 3 volumes (33 ml/g $\pm$ 3,7 em relação a matéria seca). Esses resultados sugerem a influência do método de extração e o potencial deste material para futuras aplicações. Cheng e colaboradores (2016), por exemplo, compararam amostras de colágeno da espécie *Rhopilema sculentum* com gases cirúrgicas em cirurgias de ratos com calda amputados, para a absorção e retenção do volume de sangue. Os autores concluíram que quando aplicados a esses modelos experimentais, todos os grupos de esponjas de colágeno apresentaram diminuição no tempo de hemostasia e massa de perda sangüínea quando comparados à gaze, o que pode ser atribuído à estrutura porosa e à maior absorção de água pela esponja de colágeno. Considerando as propriedades físico-químicas e a capacidade hemostática da esponja de colágeno de água-viva, como um candidato adequado para aplicações de curativos.

Já o hidrolisado proteico bruto não apresentou capacidade de absorção de água e sim solubilidade em água. Isso ocorre, principalmente, porque o processo de hidrólise acarreta no aumento de proteínas com menores pesos moleculares, as quais apresentam maior concentração de grupos hidrofóbicos expostos (CENTENARO et al. 2011), diminuindo a capacidade de absorção de água por essas moléculas.

A análise de Espectroscopia de Infravermelho com Transformada de Fourier tem como objetivo detectar os grupos funcionais presentes na amostra, baseando-se na absorção da radiação infravermelho por transições vibracionais em ligações covalentes das biomoléculas, refletindo as características bioquímicas e químicas desta amostra (BELBACHIR et al., 2009). Um feixe de infravermelho atravessa uma alíquota da amostra e a absorção da radiação infravermelha se restringe a espécies moleculares que apresentam diferenças de energia entre seus estados rotacionais e vibracionais. Desta forma, essa análise detém vantagens, tais como alta reprodutibilidade e rapidez, sendo considerada uma análise não destrutiva (ALBERO, 2009). Para identificar diferentes

tipos de colágeno por análise de FTIR, Belbachir et al. (2009) realizaram estudo comparativo entre diferentes amostras de colágeno de tecidos conectivos, a fim de evidenciar estruturas que possibilitassem a diferenciação dos tipos de colágeno. Os autores assinalam a presença de maior número de picos de absorção dentro do espectro de 1800 a 900 cm^{-1} , os quais caracterizam os grupos funcionais presentes nas cadeias de colágeno representativos do estiramento simétrico C=O, dentro do intervalo de absorção da amida I (1.700–1.600 cm^{-1}), da deformação angular no plano de ligação de CH_2 e CH_3 (1.480–1.350 cm^{-1}), do estiramento simétrico de C–N e da deformação angular no plano da ligação N–H, no intervalo de absorções de amida III (1.300–1.180 cm^{-1}) e estiramento simétrico de C–O e C–O–C dos intervalos de absorção de porções de carboidratos (1.100–1.005 cm^{-1}). Pedroso (2009) também ressalta como picos de absorção representativos das moléculas de colágeno os picos na região relacionados a amida II, devido as vibrações nos planos da ligação N-H e ao estiramento C-N na região de 1.552 cm^{-1} .

As amostras ASC, PSC e hidrolisado proteico bruto do colágeno de *R. atlanticum* apresentaram picos de maior intensidade dentro do espectro de absorção de 1654,92 cm^{-1} , 1654,92 cm^{-1} , 1647,21 cm^{-1} , que representam o estiramento da carbonila, típico da amida I (BELBACHIR *et al.* 2009; PEDROSO, 2009). No espectro de 1.600 – 1.500 cm^{-1} as amostras apresentaram picos de absorção em 1527,62 cm^{-1} , com um leve deslocamento da amostra solúvel em pepsina extraída em 0,9 M para 1529,55 cm^{-1} , espectro este relacionado à amida II (PEDROSO, 2009).

Entre os diferentes tratamentos de extração do colágeno, tanto para os espectros para o colágeno solúvel em ácido (ASC) quanto para o colágeno solúvel em pepsina (PSC), o tratamento realizado com etanol 3 volumes apresentou menor intensidade de absorção da radiação. Esse resultado pode indicar que a precipitação com etanol pode ser realizada, porém testes para avaliar o efeito da proporção de etanol em relação a amostra devem ser realizados, a fim de melhorar o rendimento e qualidade do colágeno precipitado. Outro ponto a se observar é a maior intensidade dos picos nas amostras PSC quando comparadas com os mesmos intervalos de absorção das amostras ASC. Esse perfil pode indicar a influência da solubilização da amostra ASC em NaOH, o qual pode ter destruído parte das ligações devido à elevação do pH.

O conteúdo de hidroxiprolina, através do grupamento –OH, tem sido identificado como o grande responsável pela estabilidade da tripla hélice (GIMÉNEZ &

MONTERO, 2005; GOMÉZ-GILLÉN *et al.* 2011). A quantidade de prolina e hidroxiprolina nas cadeias que formam o colágeno foram correlacionadas com as espécies e sua temperatura de vida (SUN *et al.* 2017), estando ligado também com a estabilidade térmica do colágeno perante variações de temperatura (YOU *et al.* 2011). Os anéis de pirrolidina da prolina e da hidroxiprolina contribuem para fortalecer a estrutura em tripla hélice do colágeno (NALINANON *et al.* 2011). Em nossas análises foi possível observar os picos de absorção relacionados aos anéis pirrolidínicos (na região de 1450 cm^{-1}), indicando a presença deste aminoácido na composição das cadeias dos polipeptídeos do colágeno de *R. atlanticum* na amostra do hidrolisado proteico bruto, com a maior intensidade deste pico em 1406.11 cm^{-1} .

Através da razão entre os picos de absorção representativos da amida III e dos anéis pirrolidínicos foi possível verificar a integridade das cadeias que formam a tripla hélice (PEDROSO, 2009; SILVA Jr *et al.* 2014). Quando essa relação é próxima de um, a estrutura helicoidal permanece íntegra, e quando se encontram desnaturadas, esses valores ficam em torno de 0,5 (PEDROSO, 2009). Para as amostras do colágeno PSC precipitadas em NaCl e do hidrolisado, os valores foram próximos de 1 (0,88 para ambas as amostras PSC precipitadas em NaCl e 0,85 para o hidrolisado proteico). Para o colágeno PSC precipitado em etanol não foi possível calcular essa razão, devida a má formação do pico de absorção da amida III. E para o colágeno ASC também não foi possível calcular essa razão, pois o espectro de absorção não registrou picos de absorção na região da amida III. Os resultados demonstraram a presença de colágeno, indicando que os três tratamentos de precipitação para o colágeno foram satisfatórios e que a estrutura helicoidal do colágeno se encontra, em sua maior parte, na forma íntegra, corroborando com os perfis eletroforéticos apresentados pelos géis de SDS-PAGE. Segundo Zhang *et al.*, (2014), os espectros de FTIR de colágeno de medusas apresentam diferenças quando comparados com os espectros de colágeno de peixes, registrando que os principais picos foram deslocados para frequências mais baixas ou mais altas, o que indica discrepâncias na estrutura secundária do colágeno para invertebrados e vertebrados.

A busca por peptídeos que apresentem atividade biológica foi intensificada nos últimos anos, uma vez que a demanda por alimentos mais saudáveis e a procura por substitutos naturais dos antioxidantes sintéticos utilizados pela indústria de alimentos têm crescido. Esse último, no entanto, tem sido o maior motivador dessas pesquisas,

levando em consideração estudos que demonstraram a possível atividade cancerígena de antioxidantes sintéticos em excesso, o que levou a proibição da sua utilização em alguns países da União Europeia e no Canadá (SHAHIDI & AMBIGAIPALAN, 2015). Segundo Fonseca (2014), a investigação de proteínas hidrolisadas provenientes de organismos marinhos, principalmente de pescado, são amplamente prospectados através de investigações que utilizam todas as partes do animal, das escamas até as vísceras (ZHANG et al. 2009; BOUGATEF et al. 2010; CENTENARO et al. 2011; ZHANG et al. 2011; PARK et al. 2016; AMORIM et al. 2016; FELICIAN et al. 2018), bem como a atividade antioxidante destes hidrolisados (YOU et al. 2009; YOU et al. 2011; FONSCECA, 2014; LI-CHAN, 2015; XU & REGESTEIN, 2017).

Para a avaliação da possível atividade biológica do hidrolisado proteico bruto, foram realizadas as análises de atividade antioxidante de captura do radical DPPH e do radical ABTS. Ambos os radicais utilizados neste trabalho, DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl) e ABTS (2,2'-azino-bis (3ethylbenzothiazoline-6-sulphonic acid)), fazem parte de uma categoria nomeada de HAT (*hydrogen atom transfer*), ou seja, radicais estabilizados pela doação de um hidrogênio proveniente da molécula com atividade antioxidante. Essas reações baseadas em HAT são dependentes do solvente e do pH, e geralmente muito rápidas, ocorrendo em segundos ou minutos (KARADAG et al. 2009).

Na análise da atividade antioxidante de captura do radical DPPH realizada para o hidrolisado proteico, foi observado um efeito dose:resposta quando aplicado a concentrações mais altas de hidrolisado. No entanto, foram observadas diferenças nas absorbâncias entre os brancos das amostras solubilizadas em etanol quando comparados com os brancos das amostras solubilizadas em água. Para os brancos solubilizados com água destilada foi possível observar uma diminuição da absorbância com o aumento da concentração de amostra, de acordo com o padrão seguido pela curva de calibração, que neste trabalho foi o ácido ascórbico. Esse efeito não foi observado nos brancos feitos com etanol, os quais apresentaram aparência branco-leitosa, elevando os valores de absorbância e produzindo um artefato de técnica. Esse resultado indica uma reação entre a amostra e o reativo, gerando opacidade da amostra, dificultando a leitura em espectrofotômetro. Essa aparência adquirida pela amostra pode estar relacionada com a capacidade de precipitação de proteínas do próprio DPPH (MOLYNEUX, 2004), além do efeito precipitante do etanol. Os resultados da atividade antioxidante *in vitro*,

observado por Zhuang (2009), utilizando colágeno hidrolisado da espécie de medusa *Rhopilema sculentum*, medida pela atividade sequestradora com DPPH, foi de 69,5%, enquanto para a atividade quelante de íons cobre foi de 56,5%.

Segundo Pérez-Jiménez & Calixto (2006), a capacidade antioxidante é geralmente medida em extratos aquosos-orgânicos, que podem conter não apenas os antioxidantes, mas também outros compostos não-antioxidantes, os quais podem interferir no ensaio. Estes interferentes, especialmente aminoácidos e ácidos urônicos, podem levar a uma superestimativa do efeito antioxidante.

A capacidade de captura do radical ABTS⁺ de acordo com a concentração de amostra e com o tempo de reação, foi determinada. Embora mais lenta do que o esperado, o ensaio possibilitou a constatação do aumento na atividade antioxidante com o aumento da concentração de amostra, bem como o pico de atividade em aproximadamente 40 minutos de reação. Tang *et al.* (2010) ao comparar a atividade antioxidante dos radicais DPPH e ABTS, percebeu que para o ABTS a atividade pode ser relacionada a uma curva de concentração, não ocorrendo da mesma forma para o DPPH. Os resultados foram similares para todas as amostras testadas, demonstrando comportamento semelhante tanto para as amostras de hidrolisado proteico quando para as amostras ASC, dos três tratamentos, indicando que o processo de hidrólise e a precipitação em etanol 3 volumes, não interfere na atividade antioxidante para o radical avaliado. A análise da concentração dos compostos *phenolic-like* teve como objetivo avaliar a possível produção de compostos pela reação de Maillard, durante o processo de hidrólise, que apresentassem essa característica. Segundo Yu *et al.* (2018), as reações de Maillard ocorrem a partir da interação entre grupos carbonila de açúcares redutores e grupos amina de aminoácidos livres, peptídeos ou proteínas, ocorrendo durante o processamento e armazenamento de alimentos (HOFMANN & DUNKEL, 2012). No entanto, não era esperado que as amostras *in natura* contivessem compostos fenólicos, pois os mesmos são encontrados, de forma natural, basicamente em tecidos vegetais (MAQSOOD *et al.* 2013). Sendo assim, a mensuração deste parâmetro para as amostras de hidrolisado proteico teve como objetivo avaliar a presença destes compostos ou semelhantes (*phenolic-like*), gerados durante o processo de hidrólise. É conhecida a presença de açúcares na matéria prima (YUFEROVA, 2015; BARBA *et al.* 2016; YUSUF *et al.* 2018) e a reação de Maillard poderia produzir compostos fenólicos com possível atividade antioxidante. Isso pode explicar os resultados positivos para esse

parâmetro quando aplicado o teste para as amostra de hidrolisado bruto, ao mesmo tempo indicando a presença de açúcares neste tipo de amostra, os quais podem estar ligados a aminoácidos liberados durante o processo de hidrólise. Esse fator pode levar a um efeito dose:resposta, uma vez que quanto mais aminoácidos livres, maior será a formação de compostos com atividade *phenolic-like*. Na literatura não foram encontrados registros desta análise para colágeno de medusas, mas reforçam seu potencial antioxidante.

7. CONCLUSÕES

Através deste estudo foi possível avaliar algumas características do colágeno de origem marinha, provindo da espécie *Rhacostoma atlanticum*. Em sua forma nativa essas proteínas tiveram grande capacidade de absorção de água e o processo de precipitação com etanol se mostrou viável, não alterando a composição química da proteína, demonstrando a preservação da tripla hélice bem como facilitando o processo de extração.

Como atividade de prospecção do colágeno de *Rhacostoma atlanticum* como fonte de peptídeos, a produção de um hidrolisado proteico também foi avaliada e observou-se que a matéria prima tem potencial para esse tipo de procedimento, uma vez que, através das análises de SDS-PAGE e espectrometria de infravermelho, indicaram a presença de proteínas e peptídeos. Foi observada atividade antioxidante e a presença de compostos *phenolic-like*. Se estes compostos foram formados durante o processo de hidrólise, ainda permanece para ser resolvido. Mas foi constatada atividade de captura de radicais livres. Recomenda-se a continuidade deste trabalho, buscando descobrir outras potencialidades deste hidrolisado, bem como testes *in vivo* para elucidar a atuação desta amostra dentro de sistemas biológicos (tanto animal quando humano) a fim de identificar seu processo de absorção, benefícios e seus mecanismos de ação.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Addad, S.; Exposito, J.Y.; Faye, C.; Ricard-Blum S, Lethias C. 2011. Isolation, characterization and biological evaluation of jellyfish collagen for use in biomedical applications. **Mar Drugs**; 9(6): 967–83.

- Amorim, R.G.O.; Deschamps, F.C.; Pessatti, M.L. 2016. Protein hydrolysate waste of whitemouth croaker (*Micropogonias furnieri*) as a way of adding value to fish and reducing the environmental liabilities of the fishing industry . **Latin American Journal of Aquatic Research**, 44(5): 967-974.
- Anagnostopoulou, M.A. et al. 2006 Radical scavenging activity of various extracts and fractions of sweet orange peel (*Citrus sinensis*). **Food Chemistry**. 94: 19-25.
- Bastian, T; Stokes, D; Kelleher, J.E.; Hays, G.C.; Davenport, J.; Doyle, T.K. 2010 Fisheries bycatch data provide insights into the distribution of the mauve stinger (Pelagianoctiluca) around Ireland. **ICES J. Mar. Sci.** 68(3): 436-443.
- Belbachir, K.; Noreen, R.; Gouspillou, G.; Petibois, C. 2009. Collagen types analysis and differentiation by FTIR spectroscopy. **Analytical And Bioanalytical Chemistry**, 395(3): 829-837. <http://dx.doi.org/10.1007/s00216-009-3019-y>.
- Bhagwat, P.K.; Dandge, P. B. 2018. Collagen and collagenolytic proteases: A review. **Biocatalysis And Agricultural Biotechnology**, 15: 43-55. <http://dx.doi.org/10.1016/j.bcab.2018.05.005>.
- Bougatef, A.; Nedjar-Arroume, N.; Manni, L.; Rovallec, R.; Barkia, A.; Guillochon, D.; Nasri, M.; 2010. Purification and identification of novel antioxidant peptides from enzymatic hydrolysates of sardinelle (*Sardinella aurita*) by-products proteins. **Food Chemistry**, 118 (3): 559-565. <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2009.05.021>.
- Carocho, M.; Morales, P.; Ferreira, I.C.F.R. 2018. Antioxidants: Reviewing the chemistry, food applications, legislation and role as preservatives. **Trends In Food Science & Technology**, 71: 107-120. <http://dx.doi.org/10.1016/j.tifs.2017.11.008>.
- Centenaro, G.S.; Salas-Mellado. M.; Pires, C.; Batista, I.; Nunes, M.L.; Prentice, C. 2014. Fractionation of Protein Hydrolysates of Fish and Chicken Using Membrane Ultrafiltration: Investigation of Antioxidant Activity. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, v. 172, n. 6, p. 2877–2893, 22 jan.
- Chen, S.; Chen, H.; Xie, Q.; Hong, B.; Chen, J.; Hua, F.; Bai, K.; He. J.; Yi. R.; Wu. H. 2016. Rapid isolation of high purity pepsin-soluble type I collagen from scales of

- red drum fish (*Sciaenops ocellatus*). **Food Hydrocolloids**, 52: 468-477.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.foodhyd.2015.07.027>.
- Daifuku, Miho et al. 2011. Immunostimulation Effects of Yellowtail Heart Extracts *in Vitro* and *in vivo*. **Bioscience, Biotechnology, And Biochemistry**, 75(4): 638-645. <http://dx.doi.org/10.1271/bbb.100713>.
- Barba, F.F. M.; Bazi. C.C.; Pessatti, M.L.; Resgalla Jr., C.; 2016. Macromedusae of Southern Brazil: temporal variation, population structure and biochemical composition. Brazilian Journal Of Oceanography, [s.l.], v. 64, n. 2, p.127-136, jun. 2016. FapUNIFESP (SciELO). <http://dx.doi.org/10.1590/s1679-87592016101806402>.
- Ding, J.; Li, Y.; Xu, J.; Su, X.; Gao, X.; Yue, F. 2011. Study on effect of jellyfish collagen hydrolysate on anti-fatigue and anti-oxidation. **Food Hydrocolloids**, 25(5): 1350-1353.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.foodhyd.2010.12.013>.
- Felician, F. F.; Xia, C.; Qi, W.; Xu, H.; 2018. Collagen from Marine Biological Sources and Medical Applications. **Chemistry & Biodiversity**, 15(5): 1-18.
<http://dx.doi.org/10.1002/cbdv.201700557>.
- Fonseca, Renata Aline dos Santos da. 2014. Atividade antioxidante de peptídeos provenientes de hidrolisado proteico de bijupirá (*Rachycentron Canadum*). Tese de Mestrado. Curso de Programa de Pós-graduação em Engenharia e Ciência de Alimentos, Universidade Federal do Rio Grande, Rio Grande. 128 p.
- Giménez, B.; Turnay, J.; Lizarbe, M.A.; Montero, P.; Gómez-Guillén, M.C.; Use of lactic acid for extraction of fish skin gelatin. **Food Hydrocolloids**. 19(6): 941-950. <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodhyd.2004.09.011>.
- Gómez-Guillén, M.C.; Giménez, B.; Montero, P.2005. Extraction of gelatin from fish skins by high pressure treatment. **Food Hydrocolloids**, 19(5): 923-928.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.foodhyd.2004.12.011>.
- Gómez-guillén, M.C.; Giménez, B.; López-Caballero, M.E.; Montero, M.P. 2011. Functional and bioactive properties of collagen and gelatin from alternative sources: A review. **Food Hydrocolloids**, 25(8): 1813-1827.

- Graham, W. M.; Gelcich, S.; Robinson, K. L.; Duarte, C. M.; Brotz, L.; Purcell, J. E.; Madin, L. P.; Mianzan, H.; Sutherland, K. R.; Uye, S.; Pitt, K. A.; Lucas, C. H.; Bøgeberg, M.; Brodeur, R. D.; Condon, R. H. 2014. Linking human well-being and jellyfish: ecosystem services, impacts, and societal responses. **Frontiers In Ecology And The Environment Ecological Society of America**, 12(9): 515-523.
- Hou, H.; Li B, Zhang Z, Xue C, Yu G, Wang J, Bao Y, Bu L, Sun J, Peng Z, Su S. 2012. Moisture absorption and retention properties, and activity in alleviating skin photodamage of collagen polypeptide from marine fish skin. **Food Chemistry**, 135 (3): 1432-1439. <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2012.06.009>.
- Hoyer, B.; Bernhardt, A.; Lode, A.; Heinemann, S.; Sewing, J.; Klinger, M.; Notbohm, H.; Gelinsky, M. 2014. Jellyfish collagen scaffolds for cartilage tissue engineering. **Acta Biomaterialia**, 10(2): 883-892. <http://dx.doi.org/10.1016/j.actbio.2013.10.022>.
- Hsieh, Y. H. P.; Rudloe, J. 1994. Potential of utilizing jellyfish as food in Western countries. **Trends In Food Science & Technology**, 5(7): 225-229.
- Hsieh, Y.H.P.; Leong, F.M.; Rudloe, J. 2001. Jellyfish as food. **Hydrobiologia**, 451(1-3): 11–17.
- Huang, C. et al. 2016. Isolation and characterization of fish scale collagen from tilapia (*Oreochromis sp.*) by a novel extrusion–hydro-extraction process. **Food Chemistry**, 190: 997-1006. <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.06.066>.
- Jaswir I.; Yusof, N.; Jamal P.; Jami M. S. 2017. Novel method for gelatin extraction of various local fish using High Pressure Processing (HPP). **International Food Research Journal** 24: S533-S539
- Karadag, A.; OZCELIK, B.; Saner, S. 2009 Review of Methods to Determine Antioxidant Capacities. **Food Analytical Methods**, 2(1): 41–60.
- Khong, N. M.H.; Yusoff, F. Md., Jamilah, B.; Basri, M.; Maznah, I.; Chan, K.W.; Armania, N.; Nishikawa, J. 2018. Improved collagen extraction from jellyfish (*Acromitus hardenbergi*) with increased physical-induced solubilization

processes. **Food Chemistry**, 251: 41-50.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.12.083>.

Kimura, S.; Miura, S.; Park, Y-H. 1983. Collagen as the Major Edible Component of Jellyfish (*Stomolophus nomural*). **Journal of Food Science**. 48: 1758-1760.

Krishnan, S.; Perumal, P. 2013. Preparation and biomedical characterization of jellyfish (*Chrysaora quinquecirrha*) collagen from southeast coast of India. **International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences**, 5(3): 698-701.

Laemmli, U.K. 1970. Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4. **Nature**, 227(5259): 680-685.
<http://dx.doi.org/10.1038/227680a0>.

Li-Chan, Eunice Cy, E.; 2015. Bioactive peptides and protein hydrolysates: research trends and challenges for application as nutraceuticals and functional food ingredients. **Current Opinion In Food Science**, 1:28-37
<http://dx.doi.org/10.1016/j.cofs.2014.09.005>.

Lowry, O.H.; Rosenbrough, N.J.; Farr A. 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent. **Journal of Biological Chemistry**. 1:265-275, Maryland.

Maqsood, S.; Benjakul, S.; Shahidi, F. 2013. Emerging Role of Phenolic Compounds as Natural Food Additives in Fish and Fish Products. **Critical Reviews In Food Science And Nutrition**, 53(2): 162-179
<http://dx.doi.org/10.1080/10408398.2010.518775>.

Martins, V.G.; Costa, J.A.V.; Prentice-Hernández, C.; 2009. Hidrolisado protéico de pescado obtido por vias química e enzimática a partir de corvina (*Micropogonias furnieri*). **Quim. Nova**, 32(1):61-66.

Martins, V.G.; Costa, J.A.V.; Prentice-Hernández, C.; 2009. Hidrolisado protéico de pescado obtido por vias química e enzimática a partir de corvina (*Micropogonias furnieri*). **Quim. Nova**, 32(1):61-66.

Mills, C.E. 2001. Jellyfish blooms: are populations increasing globally in response to changing ocean conditions? **Hydrobiologia**, Netherlands, 451:55-68.

- Miura, S.; Kimura, S. 1985. Jellyfish mesogloea collagen. Characterization of molecules as $\alpha 1(\alpha 2)$ heterotetramers. **Journal of Biological Chemistry**, 260: 15352-15356.
- Molyneux, P.; 2004. The use of the stable free radical diphenylpicrylhydrazyl (DPPH) for estimating antioxidant activity. **Songklanakarin J. Sci. Technol**, 26(2) : 211-21.
- Morandini, A.C.; Ascher, D.; Stampar, S.N.; F, J.F.V. 2005. Cubozoa e Scyphozoa (Cnidaria: Medusozoa) de águas costeiras do Brasil. **Iheringia. Série Zoologia**, 95(3): 281-294.
- Morishige, H.; Sugahara, T.; Nishimoto, S.; Muranaka, A.; Ohno, F.; Shiraishi, R.; Doi, M.; 2011. Immunostimulatory effects of collagen from jellyfish in vivo. **Cytotechnology**, 63(5): 481-492. DOI: 10.1007/s10616-011-9371-8.
- Nagai, T.; Ogawa, T.; Nakamura, T.; Ito, T.; Nakagawa, H.; Fujiki, K.; Nakao, M.; Yano, T. 1999. Collagen of edible jellyfish exumbrella. **J Sci Food Agric**; 79:855–8.
- Nagai, T.; Worawattanamateekul, W.; Suzuki, N.; Nakamura, T.; Ito T.; Fujiki K. 2000. Isolation and characterization of collagen from rhizostomous jellyfish (*Rhophilema asamushi*). **Food Chemistry**, 70(2): 205–208.
- Nalinanon, S.; Benjakul, S.; Kishimura, H.; Osako, K. 2010. Type I collagen from the skin of ornate threadfin bream (*Nemipterus hexodon*): Characteristics and effect of pepsin hydrolysis. **Food Chemistry**, 125(2): 500-507 <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2010.09.040>.
- Nam, K.; You, S.; Kim, S. 2008. Molecular and Physical Characteristics of Squid (*Todarodes pacificus*) Skin Collagens and Biological Properties of Their Enzymatic Hydrolysates. **Journal of Food Science**, 73(4): 249-255. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1750-3841.2008.00722.x>.
- Nishimoto, S.; Goto, Y.; Morishige, H.; Shiraishi, R.; Doi, M.; Akiyama, K.; Yamauchi, S.; Sugahara, T.; 2008. Mode of Action of the Immunostimulatory Effect of Collagen from Jellyfish. **Bioscience, Biotechnology, And Biochemistry**, 72(11): 2806-2814 <http://dx.doi.org/10.1271/bbb.80154>.

- Oliveira, V.M.; Cunha, M. N. C.; Nascimento, T. P.; Assis, C. R. D.; Bezerra, R.S.; Porto, A.L. F. 2017. Colágeno: características gerais e produção de peptídeos bioativos - uma revisão com ênfase nos subprodutos do pescado. **Acta of Fisheries and Aquatic Resources**. 5(2): 70-82.10.2312/ActaFish.2017.5.2.70-82
- Park, S. Y.; Kim, Y. S.; Ahn, C.B.; Je, J. Y. 2016. Partial purification and identification of three antioxidant peptides with hepatoprotective effects from blue mussel (*Mytilus edulis*) hydrolysate by peptic hydrolysis. **Journal Of Functional Foods**, 20: 88-95<http://dx.doi.org/10.1016/j.jff.2015.10.023>.
- Pedroso, M. G.V. 2009. **Estudo comparativo de colágeno hidrolisado e comercial com adição de PVA**. Dissertação de Mestrado. Universidade de São Paulo, Instituto de Química de São Carlos, 71 f.
- Pérez-Jiménez, J.; Saura-Calixto, F.; 2006. Effect of solvent and certain food constituents on different antioxidant capacity assays. **Food Research International**, 39(7): 791-800 <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodres.2006.02.003>.
- Prestes, R.C. 2013. Colágeno e Seus Derivados: Características e Aplicações em Produtos Cárneos. **UNOPAR Científica Ciências Biológicas e da Saúde**,15(1): 65-74.
- Purcell, J.E.; Uye, S.I.; Lo, W.T. 2007. Anthropogenic causes of jellyfish blooms and their direct consequences for humans: a review. **Mar. Ecol. Prog. Ser.** 350: 153–174.
- Purcell, J.E.; Uye, S.I.; Lo, W.T. 2007. Anthropogenic causes of jellyfish blooms and their direct consequences for humans: a review. **Mar. Ecol. Prog. Ser.** 350: 153–174.
- Resgalla JR, C.; Gonçalves, V. C.; Klein, A. H. F. 2005. The occurrence of jellyfish stings on the Santa Catarina coast, southern Brazil. **Brazilian Journal of Oceanography**, 53(3-4): 183-186. DOI: 10.1590/s1679-87592005000200008.
- Resgalla JR, C.; Gonçalves, V. C.; Klein, A. H. F. 2005. The occurrence of jellyfish stings on the Santa Catarina coast, southern Brazil. **Brazilian Journal of Oceanography**, 53(3-4): 183-186. DOI: 10.1590/s1679-87592005000200008.

- Roman, J. A.; Sgarbieri, V. C. **2005**. Efeito da Hidrólise Enzimática Sobre Propriedades Funcionais de Caseína Bovina coagulada pela ação da Quimosina **Ciênc. Tecnol. Aliment.**, Campinas, 25(3): 468-474.
- Schroeder, R.; Branco, J.O.; Freitas JR., F.; Resgalla JR., C. 2014. Preliminary assessment of the jellyfish bycatch captured off southern and southeastern Brazil. **Lat. Am. J. Aquat. Res.** 42(2): 289-300.
- Schmidt, M. M.; Dornelles, R. C. P.; Mello, R. O.; Kubota, E. H.; Mazutti, M. A.; Kempka, A. P.; Demiate, I. M. 2016. Collagen extraction process. **International Food Research Journal** 23(3): 913-922.
- Schmidt, M.M.; Dorneller, R.P.; Mello, R.O.; Kubota, E.H.; Mazutti, M.A.; Kempka, A.P.; Demiate, I.M. 2016. Collagen extraction process. **International Food Research Journal**. 23(3):913-922.
- Shahidi, F.; Ambigaipalan, P. 2015. Phenolics and polyphenolics in foods, beverages and spices: Antioxidant activity and health effects – A review. **Journal of Functional Foods**, 18: 820-897. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jff.2015.06.018>.
- Silva, T.H.; Silva, J.M.; Marques, A.L.P.; Domingues, A.; Bayon, A.; Reis, R.L. 2014. Marine Origin Collagens and Its Potential Applications. *Marine Drugs*, 12(12): 5881-5901. <http://dx.doi.org/10.3390/md12125881>.
- Sugahara, T.; Ueno, M.; Goto, Y.; Shiraishi, R.; Doi, M.; Akiyama K.; Yamauchi, S. 2006. Immunostimulation Effect of Jellyfish Collagen. **Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry**, 70(9): 2131-2137. DOI: 10.1271/ bbb.60076
- Sun, L.; Li B.; Song W.; Si L.; Hou H.; Characterization of Pacific cod (*Gadus macrocephalus*) skin collagen and fabrication of collagen sponge as a good biocompatible biomedical material. **Process Biochemistry**, S1359-5113 <http://dx.doi.org/10.1016/j.procbio.2017.08.003>.
- Tang, X. et al. 2010. Peptide Fractionation and Free Radical Scavenging Activity of Zein Hydrolysate. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 58(1): 587–593.
- Wang, S.; Agyare, K.; Damodaran, S. 2009. Optimisation of hydrolysis conditions and fractionation of peptide cryoprotectants from gelatin hydrolysate. **Food Chemistry**, 115(2): 620-630. <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2008.12.079>

- Xu, J.; Li, Y.; Regenstein, J.; Su, X.; 2017. In vitro and in vivo anti-oxidation and anti-fatigue effect of monkfish liver hydrolysate. **Food Bioscience**, 1(18)9-14.Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.fbio.2017.03.002>.
- Xu, J.; Zhao, Q.; Qu, Y.; Ye, F. 2013. Antioxidant activity and anti-exercise-fatigue effect of highly denatured soybean meal hydrolysate prepared using neutrase. **Journal Of Food Science And Technology**, 52(4)1982-1992. Nature. <http://dx.doi.org/10.1007/s13197-013-1220-7>.
- You, L.; Zhao, M.; Cui, C.; Zhao, H.; Yang, B. 2009. Effect of degree of hydrolysis on the antioxidant activity of loach (*Misgurnus anguillicaudatus*) protein hydrolysates. **Innovative Food Science & Emerging Technologies**, 10(2): 235-240.<http://dx.doi.org/10.1016/j.ifset.2008.08.007>.
- You, L.; Zhao, M.; Regenstein, J. M.; Ren, J. 2011. In vitro antioxidant activity and in vivo anti-fatigue effect of loach (*Misgurnus anguillicaudatus*) peptides prepared by papain digestion. **Food Chemistry**, 124 (1): 188-194. <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2010.06.007>.
- Yu. M.; He, S.; Tang, M.; Zhang, Z.; Zhu, Y.; Sun, H.; 2018. Antioxidant activity and sensory characteristics of Maillard reaction products derived from different peptide fractions of soybean meal hydrolysate. **Food Chemistry**, 1(243):249-257. <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.09.139>.
- Yuferova, A. A. 2015. The Impact of Different Drying Modes of Scyphozoan Jellyfish *Rhopilema Esculentum* and *Aurelia Aurita* on the Protein and Carbohydrate Components in their Composition and the Possibility of Their Use as Dried Prepared Food. **Journal of Food Process Engineering**, 40 (1): .12326-12334. <http://dx.doi.org/10.1111/jfpe.12326>.
- Yusuf, S; Fahmid, I. M; Abdullah, N. 2018. Indonesian jellyfish as potential for raw materials of food and drug. **Iop Conference Series: Earth and Environmental Science**, 157: 012056-012060. <http://dx.doi.org/10.1088/1755-1315/157/1/012056>.
- Zhang, F.; Wang, A.; Li, Z.; He, S.; Shao, L. 2011. Preparation and Characterisation of Collagen from Freshwater Fish Scales. **Food and Nutrition Sciences**, 2: 818-823 doi:10.4236/fns.2011.28112

- Zhang, J.; Duan, R.; Tian, Y.; Konno, K.; 2009 Characterisation of acid-soluble collagen from skin of silver carp (*Hypophthalmichthys molitrix*). **Food Chemistry**, 116(1): 318-322. <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2009.02.053>.
- Zhang, J.; Duan, R.; Huang, L.; Song, Y.; Regenstein, J. M. 2014. Characterisation of acid-soluble and pepsin-solubilised collagen from jellyfish (*Cyanea nozakii Kishinouye*). **Food Chemistry**, 150: 22-26. <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2013.10.116>.
- Zhang, Q.; Wang, Q.; Lv, S.; Lu, J.; Jiang, S.; Regenstein, J.M.; Lin, L. 2016. Comparison of collagen and gelatin extracted from the skins of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) and channel catfish (*Ictalurus punctatus*). **Food Bioscience**, 13: 41-48. <http://dx.doi.org/10.1016/j.fbio.2015.12.005>.
- Zhuang, Y.; Sun, L.; Zhang, Y.; Liu, G.; 2012. Antihypertensive Effect of Long-Term Oral Administration of Jellyfish (*Rhopilema esculentum*) Collagen Peptides on Renovascular Hypertension. **Mar Drugs**. 10(2): 417–426. doi: 10.3390/md10020417

