

UNIVERSIDADE FEDERAL DE
ALAGOAS CENTRO DE TECNOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO
EM ENGENHARIA QUÍMICA

PPGEQ UFAL
Programa de Pós-Graduação em
Engenharia Química

ADMIR SENDY SANTOS ALVES

**COLAGENO HIDROLISADO DA PELE DE TILÁPIA (*OREOCHROMIS
NILOTICUS*): AVALIAÇÃO DO EFEITO DA AGITAÇÃO E MISTURA NO
PROCESSO EXTRAÇÃO, PURIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO.**

ADMIR SENDY SANTOS ALVES

COLAGENO HIDROLISADO DA PELE DE TILÁPIA (*OREOCHROMIS NILOTICUS*): AVALIAÇÃO DO EFEITO DA AGITAÇÃO E MISTURA NO PROCESSO EXTRAÇÃO, PURIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO.

Mestrando: Admir Sendy Santos Alves

Orientadora: Prof.ra Dra. Tatiane Luciano Balliano

Co-orientador: Prof. Dr João Inácio Soletti

Área:PROCESSOS QUÍMICOS, BIOTECNOLÓGICOS

(Tratamento de resíduos Pesqueiros)

Catálogo na fonte
Universidade Federal de Alagoas
Biblioteca Central
Bibliotecário: Marcelino de Carvalho

A474c Alves, Admir Sedy Santos.

Colageno hidrolisado da pele de tilápia (*Oreochromis niloticus*) : avaliação do efeito da agitação e mistura no processo de extração, purificação e caracterização / Admir Sedy Santos Alves. – 2019.

61 f. : il. color.

Orientadora: Tatiane Luciano Balliano.

Co-orientador: João Inácio Soletti.

Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) – Universidade Federal de Alagoas. Centro de Tecnologia. Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química. Maceió, 2019.

Bibliografia: f. 51-61.

1. Tilápia - Tratamento. 2. Poluição ambiental. 3. Resíduos de animais - Pescados. 4. Tilápia - Proteína. 5. Fenômenos químicos. 6. Colágeno - Hidrólise. I. Título.

CDU: 66.0:567:547.962.9

Admir Sendy Santos Alves

**“COLÁGENO HIDROLISADO DA PELE DE TILÁPIA
(*Oreochromis niloticus*): AVALIAÇÃO DO EFEITO DA
AGITAÇÃO E MISTURA NO PROCESSO DE EXTRAÇÃO,
PURIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO.”**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Alagoas, como requisito para a obtenção do Título de Mestre em Engenharia Química.

Aprovada em: Maceió, 04 de Fevereiro de 2019.

BANCA EXAMINADORA

Tatiane Luciano Balliano.

Prof.^a Dr.^a Tatiane Luciano Balliano (PPGEQ/UFAL – Orientadora)

João Inácio Soletti

Prof. Dr. João Inácio Soletti (PPGEQ/UFAL - Coorientador)

Carlos Eduardo de Farias Silva

Prof. Dr. Carlos Eduardo de Farias Silva (PPGEQ/UFAL)

Cenira Monteiro de Carvalho

Prof.^a Dr.^a Cenira Monteiro de Carvalho (IQB/UFAL)

OFERECIMENTO/DEDICO

*Dedico esse trabalho em especial a minha
família, e todos que me proporcionaram um meio pra
atingir esse objetivo.*

*“ A mente que se abre a uma nova ideia jamais
voltará ao seu tamanho original “*

ALBERT EINSTEIN

AGRADECIMENTO

Agradeço primeiramente Deus pela vitória e força de nunca ter me deixado desistir e sempre estar presente em todos os momentos da minha vida.

Agradeço aos meus pais, **Carlos Alberto Rodrigues de Pina Alves** e **Maria Quita Vieira Santos** por todo amor e dedicação, e pela confiança e incentivo.

Aos meus avós paternos **Ana Gabriela Rodrigues Pina** e **Manuel Santos Alves** pelo carinho, bondade e amor que sempre me ofereceram e aos meus avós maternos Simão Vieira dos Santos e Edith Vieira Santos pelo carinho e amor

Aos meus irmãos, **Nicholas Rodrigues Santos Alves** e **Elder Lucindo Vieira dos Santos** e minha irmã **Rilda Mosso Santos de Pina** pela força, carinho e amor, e aos meus tios, sobrinhos e primos pela amizade e confiança

A minha orientadora, **Tatiane Luciano Balliano** e Co-orientador, **João Inácio Soletti** por todo incentivo, confiança e por compartilhar conhecimentos, seja na sala de aula ou na bancada do laboratório, pelas oportunidades, paciência e amizade que me foram concedidas e contribuíram para o meu desenvolvimento profissional.

Aos professores **Carlos Eduardo de Farias Silva**, **Valéria Rodrigues dos Santos Malta** e **Sonia Salgueiro Machado** pelo tempo disponibilizado, amizade, carinho e apoio nos trabalhos experimentais.

A minha namorada **Mariana Sarah Suica Torres** pela força nos momentos difíceis, compreensão, confiança e por todo incentivo, carinho, paciência e amor.

Aos meus caros amigos e colegas do laboratório LABIOCRIMM, LTBA, LAMP, **Gabriela da Costa Carvalho**, **Venancio Vitor Lima da Silva Bezerra**, **Milena Alves dos Santos**, **Jefferson Alves Bezerra**, **Pedro Henrique Malta**, **Cícero Porfírio Tenório Júnior**, **Heder Simedo**, **Anatolio Fonseca**, **Keila Moreno**, **Rafael Pires**, **Kledson Lopes Barbosa**, **Cledson Barros de Souza**, **Jumelice dos Santos Silva**.

Aos funcionários da UFAL e todos que de alguma forma contribuíram para o meu crescimento e desenvolvimento como pessoa física e como um profissional.

RESUMO

Nos últimos anos foi constatado um crescimento considerável, do consumo de pescados principalmente em função do aumento da população e pela demanda de alimentos mais saudáveis. A tilápia (*Oreochromis niloticus*) é uma espécie de peixe rico em proteínas e um excelente iguaria na culinária brasileira, porém o processo de obtenção do filé gera grandes quantidades de resíduos como vísceras, escamas, ossos e pele que são despojadas no ambiente sem qualquer tipo de tratamento. A produção do colágeno e hidrolisados a partir desses resíduos vem mudando o cenário das indústrias visto que apresentam propriedades emulsificantes, agentes espumantes, estabilizantes coloidais, películas biodegradáveis, agentes microencapsulantes, com a tendência de substituir o material sintético, pelo natural com uma bioatividade e biocompatibilidade para aplicações medicinais. O presente trabalho apresenta a otimização do o processo de extração em que o método empregado foi o de, ácido-base, onde a pele foi tratada utilizando soluções de NaCl (0,8 M), NaOH (0,1M) e ácido acético (0,05 M), visando o desacoplamento do colágeno e sua extração juntamente com outras proteínas e contaminantes. A purificação foi realizada através de etapas de centrifugações e processos de precipitações salinas, removendo as proteínas não colagenosas. A proteína de interesse foi quantificada pelo método de Bradford, obtendo um rendimento máximo de % com o impelidor tipo turbina e velocidade de rotação 400rpm. A pureza indicou os tipos de cadeias α , β e γ) que fazem parte do colágeno tipo I e que estavam presentes no material obtido no referido processo, teve sua presença confirmada através de análise de gel de eletroforese SDS 12%. O método de FTIR também foi empregado e seus resultados apresentaram picos que comprovam a existência da estrutura helicoidal tripla pertencente ao colágeno.

Palavras-Chaves: Tratamento. Poluição Ambiental. Resíduos de Pescado. Proteína

ABSTRACT

In recent years there has been a considerable increase in fish consumption, mainly due to the increase in population and the demand for healthier foods. Tilapia (*Oreochromis niloticus*) is a species of fish rich in proteins and an excellent delicacy in Brazilian cuisine, but the process of achievement filé generates large amounts of residues such as viscera, scales, bones and skin that are stripped in the environment without any type treatment. The production of collagen and hydrolyzates from these residues has been changing the industry scenario since they have emulsifying properties, foaming agents, colloidal stabilizers, biodegradable films, microencapsulating agents, with the tendency to substitute the synthetic material for natural with a bioactivity and biocompatibility for medical applications. In the acid-base extraction method, the skin was treated using solutions of NaCl (0.8 M), NaOH (0.1 M) and acetic acid (0.05 M), aiming at the decoupling of collagen and its extraction together with other proteins and contaminants. The purification was performed through centrifugation steps and saline precipitation processes, removing non-collagenous proteins. The protein of interest was quantified by the Bradford method, maximum yield of 71.06% with the turbine impeller and rotational speed 400rpm. The purity indicated the types of chains (α , β and γ) that are part of the type I collagen and that were present in the material obtained in said process, had its presence confirmed through analysis of 12% SDS electrophoresis gel. The FTIR method was also employed and its results showed peaks that prove the existence of the triple helical structure belonging to collagen.

Keywords: Treatment. Environmental Pollution. Fish Residues. Protein

LISTA DE FIGURA

Figura 1- Representação da estrutura e aminoácidos do colágeno Pro(azul)-Hyp(amarelo) Gly(vermelho)	10
Figura 2-Illustração dos impelidores tipo pá inclinada e turbina.....	17
Figura 3-Produção de pescado no brasil por região em toneladas	20
Figura 4-Illustração da Tilápia do Nilo (Oreochromis niloticus)	22
Figura 5-Países emergentes na produção da tilápia	23
Figura 6-Descarne e lavagem da pele	26
Figura 7-Fluxograma do processo de extração, purificação do colágeno	28
Figura 8-Curva padrão de reagente de Bradford	31
Figura 9-Representação gráfica dos impelidores tipo turbina(A) e pá inclinada (B) em relação ao pH da reação	34
Figura 10-Representação gráfica dos impelidores tipo turbina (D) e pá inclinada (C) em relação ao pH da reação	36
Figura 11-Electroforese em gel de SDS-poliacrilamida a 12% de colágeno hidrolisado bruto da pele de tilapia (Oreochromis niloticus).	38
Figura 12-Leitura no gel das amostras de Colágeno hidrolisado (rotoevaporado) (1); Comercial (2); Colágeno hidrolisado Ácida (3)	39
Figura 13-Espectro de FTIR para o colágeno hidrolisado de pele de tilápia	41
Figura 14-Espectro de FTIR de colágeno comercial	43

LISTA DE TABELA

Tabela 1-Representação dos tipos de colágenos e suas respectivas localizações ..	11
Tabela 2-Processos de agitação mistura e dispersão.....	16
Tabela 3-Rendimento e método de extração de colágeno (*ASC - Método Ácido-Solúvel e PSC - Método Pepsina-Solúvel) em diferentes espécies.	18
Tabela 4-As espécies mais comuns produzidas no brasil, por região.....	21
Tabela 5-Representação dos Parâmetros a serem analisados.....	27
Tabela 6- Fracionamento salino	29
Tabela 7-Composição do gel de resolução 12%.....	30
Tabela 8-Tabela de HAc em função da quantidade de proteínas	33
Tabela 9-Representação de valores de pH em função da Absorbância da proteína	35
Tabela 10- Rendimento de acordo com a rotação e impelidores	37
Tabela 11- Representação das bantas e peso molecular de proteína do colágeno..	39
Tabela 12-Principais grupos observados no espectro.....	42
Tabela 13-Principais grupamentos observados no espectro de infravermelho para colageno hidrolisado comercial.	44

LISTA DE ABREVIATURAS

ABNT - Associação Brasileira de Normas Técnicas

ASC - Método Ácido-Solúvel

FAO - Organização das Nações Unidas para a Alimentação e a Agricultura

IICA - Instituto Interamericano de Cooperação para a Agricultura

MPA - Movimento dos Pequenos Agricultores

EEB -Encefalopatia Espongiforme Bovina

OMS - Organização Mundial de Saúde

NBR - Norma Brasileira os resíduos pesqueiros

PSC - Método Pepsina-Solúvel

LTBA - Laboratório de Tecnologia em Bebidas e Alimentos

LAMP - Laboratório de Metabolismo e Proteômica

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO	8
2.	OBJETIVOS	9
2.1.	Objetivo Geral	9
2.2.	Objetivo Específico.....	9
3.	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	10
3.1.	Tipos de colágenos	11
3.2.	Estrutura e funções do colágeno	14
3.3.	Importância Biológica do Colágeno	15
3.4.	Processos de Obtenção do Colágeno	15
3.5.	Mercado de Pescados	19
3.6.	Espécies de Tilápia	21
3.7.	Resíduos Pesqueiros	24
4.	METODOLOGIA	26
4.1.	Local do Experimento.....	26
4.2.	Os Resíduos da Tilápia e Pré-Tratamento.	26
4.3.	Processos de Extração e Purificação do Colágeno.....	27
4.3.1.	Processo de agitação e mistura	27
4.3.2.	Extração do colágeno pelo método de ácido.....	27
4.3.3.	Purificação precipitação e diálise do extrato proteico.....	28
4.3.4.	Precipitação com sulfato de amônio.....	28
4.3.5.	Dialise.....	29
4.4.	Avaliação da Pureza da Proteína	29
4.4.1.	Eletoforeses em gel de poliacrilamida (SDS- PAGE).....	29
4.5.	Quantificação de Proteína-Método de Bradford	30
4.6.	Avaliações do Rendimento	31
4.7.	Espectroscopia no Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR)....	31
5.	RESULTADOS E DISCUSÃO	33
5.1.	Pré-teste do Ácido Acético (HAc)	33
5.2.	Processo de Agitação.....	34
5.3.	Rendimento do processo.....	36
5.4.	Pureza do colágeno.....	37
5.5.	Espectroscopia de absorção na região do infravermelho(FTIR)	41
6.	CONCLUSÃO	45
7.	PERSPECTIVAS	46
8.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	47

1. INTRODUÇÃO

A demanda mundial por pescados nos últimos anos tem apresentado um crescimento considerável, principalmente em função do aumento da população e pela demanda de alimentos mais saudáveis, ricos em proteínas e livre de agrotóxicos. De acordo com SGARBIERI, (1999) o pescado é uma excelente fonte de nutrientes, pois seus músculos são compostos de proteínas de elevado valor nutricional por conterem alta porção de aminoácidos essenciais, particularmente aqueles que são limitantes em proteínas de origem vegetal

No entanto sabe-se que no processo de geração de produtos pesqueiros há sempre o acúmulo de resíduos biológicos, um exemplo é o processo de filetagem que pode gerar até 70% de resíduo que incluem: cabeça (14%), carcaça (35%), vísceras (10%), pele (10%) e escamas (1%) (BUENO, 2008). Estes resíduos por não terem valor econômico agregado são depositos no ambiente de qualquer forma causando o mau cheiro e atração de insetos, o que confere riscos à saúde pública de ribeirinhos e em diversos outros ambientes (ALVES, 2016). Uma das formas de aproveitar esses resíduos descartados é a produção de proteínas, por exemplo a obtenção de colágeno da pele de tilápia do nilo.

No Brasil, a maior parte do colágeno é proveniente dos subprodutos da indústria de carne bovina, em função de sua elevada produção para exportação. Porém, o surto de Encefalopatia Espongiforme Bovina (EEB) e questões religiosas, recorrentemente, apresentam-se como obstáculos para o contínuo uso do colágeno originário dessas fontes (SADOWSKA et al., 2003; SILVA & PENNA, 2012). Sendo assim nos últimos anos o colágeno extraído de pele de peixe vem ganhando espaço e atenção.

Segundo LEE e colaboradores, (2001) o colágeno possui propriedades naturais que incluem baixa resposta imunológica, baixa toxicidade e habilidade de promover o crescimento celular e a reconstrução (*in vitro* e *in vivo*) da estrutura microfibrilar encontrada em tecidos naturais, podendo ser aplicados nas indústrias alimentícias, farmacêutica e de cosméticos. Neste sentido, este estudo busca otimizar o processo de obtenção de colágeno hidrolisado, bem como, avaliar a viabilidade da produção a partir de resíduos de pescados para aplicação nas diferentes indústrias que empregam este produto como matéria prima.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo Geral

Otimização do processo de obtenção de colágeno hidrolisado a partir de resíduos pesqueiros utilizando a pele da espécie *Oreochromis niloticus* e empregando metodologia de baixa complexidade e custos para aplicação industrial.

2.2. Objetivo Específico

- Extração de colágeno a partir da pele do peixe (*Oreochromis niloticus*);
- Parcial Purificação e rendimento do colágeno mediante o método empregado;
- Avaliar a influência da agitação no processo de extração a partir de diferentes impelidores e velocidade de agitação no rendimento da reação;
- Determinar a carga da proteína de colágeno hidrolisado tipo I;
- Caracterização do produto obtido utilizando a técnica FTIR.

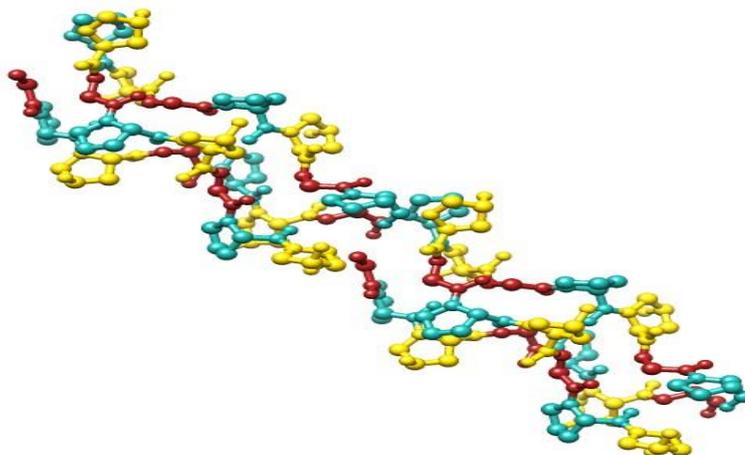
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

A palavra colágeno é derivado de dois termos gregos onde KOLLA significa cola, e GENNO que significa produção (SHIMOKOMAKI,1992). Colágeno é a proteína fibrosa de origem animal e mais abundante em mamíferos, representando 30% das proteínas totais e 6% em massa do corpo humano (TONHI & PLEPIS, 2002).

De acordo com as pesquisas de Prestes e colaboradores (2013), o colágeno apresenta na sua família 27 isoformas de proteínas, sendo o principal elemento estrutural dos tecidos conjuntivos ao longo do corpo, como ossos, tendões, cartilagem, veias, pele, dentes, vasos sanguíneos, córneas bem como nos músculos e demais órgãos dos vertebrados. O colágeno é constituído de cadeias peptídicas dos quais os aminoácidos são representados por 30% de glicina, 12% de prolina, 11% de alanina, 10% de hidroxiprolina, 1% de hidroxilisina e pequenas quantidades de aminoácidos polares carregados.

De acordo com Johnse Courts (1977) o colágeno é uma proteína caracterizada pelo alto teor de glicina, prolina e hidroxiprolina, podendo sofrer desnaturação na presença de soluções ácidas diluídas e convertido em proteína solúvel como a gelatina, quando solubilizado em soluções aquecidas. Segundo Motta (2003), o colágeno é composto por três cadeias principais, glicina, prolina e hidroxiprolina, que entrelaçam as suas cadeias α entre si formando macromoléculas de hélice triplaestável (figura 1).

Figura 1- Representação da estrutura e aminoácidos do colágeno Pro(azul)-Hyp(amarelo) Gly(vermelho)



3.1. Tipos de colágenos

De acordo com Fessler (1974) a composição de aminoácidos presentes no colágeno varia de acordo com a espécie, tecidos e a forma de extração. Atualmente a literatura reporta a existência de pelo menos 19 tipos de colágeno que são denominados a partir algarismos romanos e vão I a XIX como representado na Tabela 1 (GONÇALVES et al, 2015). Segundo DARMODARA e colaboradores (2010), alguns deles já foram identificados e caracterizados como colágeno fibroso estriado - os tipos I, II e III, e não fibroso os tipos IV ou da membrana basal são denominados miofibrilares os tipo VI e VII ou matriz miofibrilar, os pericelulares são os tipos V, IX e X e os que ainda não foram classificados são os tipos VIII e XI.

Tabela 1-Representação dos tipos de colágenos e suas respectivas localizações

Tipo de colágeno	Localização nos diversos tecidos
I	É o tipo mais comum, são encontrados nos tendões, derme, nos ossos e até mesmo na córnea. Forma fibras e feixes de colágeno.
II	Encontrado em, cartilagem elástica e hialina, discos intervertebrais e nos olhos, a sua síntese ocorre nos condroblastos. Muito parecido com colágeno Tipo I.
III	Abundando no tecido conjuntivo frouxo, é encontrado na artéria aorta do coração, nos pulmões, nos músculos dos intestinos, fígado, no útero.
VI	Presente nos rins, na lâmina basal e na cápsula do cristalino, apresenta a função de sustentação e filtração.
V	Encontrado nos ossos, sangue, placenta, tendões e também na pele, presente em estruturas de grande resistência as tensões, como o colágeno Tipo I.

VI	Presente no tecido conjuntivo, no sangue, na placenta, discos intervertebrais, na pele e também se associa ao colágeno Tipo I.
VII	Localizado na junção dermo-epitelial e nas células corioamnióticas.
VIII	Presente em algumas células endoteliais.
IX	Interage com o Tipo II, é encontrado nas cartilagens, na retina e na córnea. Tem função de manter as células unidas conferindo resistência à pressão.
X	Encontrado nas cartilagens hipertróficas em mineralização.
XI	Interage com os Tipos II e XI. É encontrado nas cartilagens e nos discos intervertebrais.
XII	É encontrado em locais submetidos a altas tensões como nos tendões e nos ligamentos e interage com os Tipos I e III.
XIII	Interage com os colágenos dos tipos I e III e é encontrado abundantemente em interação com proteínas associada à membrana celular e nas células endoteliais.
XIV	Encontrado na pele e nos tendões.
XV	Encontrado nas células do músculo liso e nas células chamadas fibroblastos.
XVI	Encontrado nas invaginações da derme para epiderme e nos fibroblastos.
XVII	Abundante na junção dermo-epidermal.
XVIII	Encontrado facilmente em tecidos com alto índice de vascularização.
XIX	Encontrado apenas em células tumorais.

Segundo Frenzem e colaboradores, (2013) o colágeno do tipo I é o mais abundante constituindo cerca de 80% do colágeno do organismo. É o tipo de colágeno mais desejado pelas indústrias devido às suas propriedades físico-químicas e mecânicas, tornando-se alvo para a produção de biomateriais para uso na engenharia de tecidos e de alimentos (OLIVEIRA et al. 2017a).

A capacidade de automontagem e propriedade intrínseca do colágeno tipo I permitem formar espontaneamente fibrilas *in vitro*, semelhantes às observadas em experimentos *in vivo*, facilita a aplicação em diferentes setores da indústria justificando assim o alto interesse na sua comercialização (ZOU et al., 2016). No entanto são necessárias mais informações na automontagem do colágeno tipo I de diferentes espécies para que se tenha maior proveito na sua utilização para fins médicos e cosméticos (NOITUP et al., 2006)

Segundo Torley e colaboradores, (2000) o colágeno tipo I é uma macromolécula de três cadeias polipeptídicas duas $\alpha 1$ idênticas e uma $\alpha 2$ homóloga, mas quimicamente distintas, formando uma estrutura central helicoidal e as extremidades aminica e carboxílica em formato globular. O colágeno tipo I, é constituído aproximadamente por 1.014 resíduos de aminoácidos na sua cadeia de polipeptídeos com sequência repetida de (Gly-X-Y) $_n$, onde Gly corresponde ao aminoácido glicina e quase sempre X e Y é representado pela prolina e hidroxiprolina ou hidroxilisina respectivamente (PRESTES et al., 2013a). De acordo com Schrieber, (2007) e Gómez-Guillén (2002) pode ocorrer aproximadamente 334 repetições desta sequência e a estrutura primária pode alcançar até 100 kDa.

Os outros aminoácidos que compõem a estrutura do colágeno podem ser formados a partir da hidroxilação pós translacional de prolina e lisina pela prolil hidroxilase e pela lisil hidroxilase, respectivamente (IANNOTTI et al, 2014).

A glicina (Gly) garante as características das sequências de colágeno permitindo assim o fechamento da estrutura de tripla hélice já a prolina e hidroxiprolina são responsáveis pela estrutura secundária do colágeno e pela estabilidade da tripla hélice (SANTOS., 2017). Esta sequência do colágeno é extremamente importante pois permite a obtenção das fibrilas para iniciar o processo de formação das fibras, oferecendo integridade estrutural (PRESTE et al., 2012b).

Figueiredo (2015), relata que existe uma repetição de glicina em cada três sequências de aminoácidos que tornam a distância da cadeia α encurtada e o espaço minimizado para formar uma estrutura helicoidal mais estável, uma vez que a glicina apresenta menores grupos laterais.

3.2. Estrutura e funções do colágeno

A estrutura do colágeno apresenta aminoácidos com composições variadas e diferentes classificações (PRESTES et al., 2013c). De acordo com Deman (1999) o colágeno tem uma unidade básica chamada de tropocolágeno que é formada por uma molécula linear entrelaçada em formato helicoidal com 180nm de comprimento, 1,4 a 1,5nm de largura e massa molar de 360 kDa, que são ancoradas umas nas outras por ligação de hidrogênio.

Segundo Franzen e colaboradores (2013), existem ainda na estrutura do colágeno regiões terminais amino e carboxi denominadas telopeptídeos constituídas de 9-26 aminoácidos nas extremidades da molécula que não formam a estrutura da hélice, no entanto em nível de observação estrutural de escala amplificada pode-se constatar a auto-organização longitudinal e bilateral dentro das fibrilas com periodicidade distinta no processo chamado de fibrilogênese.

As cadeias polipeptídicas do colágeno são organizadas de forma paralela a um eixo, formando moléculas ainda maiores chamados de fibras de colágeno, que proporcionam resistência e elasticidade compacta diferente de algumas das proteínas globulares, que entrelaçam a sua estrutura (SILVA & PENNA., 2012a)

Ainda o colágeno apresenta propriedades mecânicas singulares quimicamente inertes, sendo que em virtude da grande concentração de aminoácidos hidrofóbicos as suas fibras são insolúvel em água proporcionando uma alta força elásticas com capacidade de hidratação, reabsorção e baixa antigenicidade (FRIESS.,1998).

Rustad (2003) relata que o colágeno, em sua forma purificada, possui várias aplicações na indústria farmacêutica e de cosméticos. A qualidade e aplicação específica do colágeno extraído, está diretamente relacionada com suas propriedades funcionais e pureza.

Existem várias alternativas para o uso do colágeno, como, por exemplo, a utilização em indústrias alimentícias para melhorando a estabilidade, elasticidade e

consistência dos alimentos, também podem realizar processos de encapsulamento e formação de película comestível auxiliando as indústrias farmacêuticas de embalagens e cosméticos (MONTERO et al., 2011).

3.3. Importância Biológica do Colágeno

Estudos mostram que o colágeno possui propriedades naturais que incluem baixa resposta imunológica, baixa toxicidade, a habilidade de promover o crescimento celular e a reconstrução *in vitro* da estrutura microfibrilar encontrada em tecidos naturais (LEE et al., 2001a). Ainda, o colágeno possui a capacidade de formar fibras insolúveis que estão presentes durante o desenvolvimento embrionário no processo inicial de diferenciação dos tecidos (FRIESS., 1998a).

Na hidrólise enzimática do colágeno e seus subprodutos se tem estudado a capacidade de obter atividades bioativas, tais como, agentes antimicrobianos, antioxidantes e anti-hipertensivos (MONTERO et al., 2011a).

Além disso o colágeno é amplamente utilizado na indústria de alimentos, cosméticos e fármacos, devido às suas propriedades multifuncionais: habilidade de formar géis estáveis e reversíveis (ALMEIDA et al., 2010; SILVA et al., 2011).

Contribuem ainda na consistência, estabilidade e a qualidade dos alimentos e bebidas, aumentando o seu valor nutricional e monetário, como por exemplo a produção de peptídeos bioativos de colágeno de peixes para elaboração de bebidas probióticas (HASHIM et al., 2015).

A ingestão de colágeno pode evitar doenças cardiovasculares, melhorar a firmeza da pele, proteger contra danos nas articulações, ajudar no tratamento contra osteoporose, prevenir o envelhecimento e ser anti-hipertensivo (PORFÍRIO., 2016).

Na obtenção de proteínas de qualquer natureza é importante ressaltar as diversas metodologias que garantem um padrão de pureza das amostras, visto que é fundamental a importância de cada etapa da a qualidade do produto gerado.

3.4. Processos de Obtenção do Colágeno

O colágeno pode ser obtido a partir de diversas espécies animais (bovinos, suínos, peixes). No Brasil, a maior parte do colágeno é proveniente dos subprodutos

da indústria de carne, devido à grande carga elevada de produção brasileira de carne para exportação proveniente dos rebanhos de gados (BASSO et al., 2013)

As propriedades físico-químicas do colágeno são fortemente influenciadas pelo processo de agitação, extração e pela matéria-prima (OLIVEIRA et al., 2017b). A agitação é um processo que fornece movimentos ao líquido auxiliando na realizar de processos químicos e físicos aplicados em diversas áreas da indústria como mineração, alimentos, petróleo, produtos e farmacêuticos, tratamento de efluentes, entre outras muitas aplicabilidades. Ainda para se ter um conhecimento sobre o sistema de agitação é necessário o entendimento dos diversos processos químicos e físicos e suas aplicações conforme é mostrado na tabela 2 (JUNIOR et al., 2012).

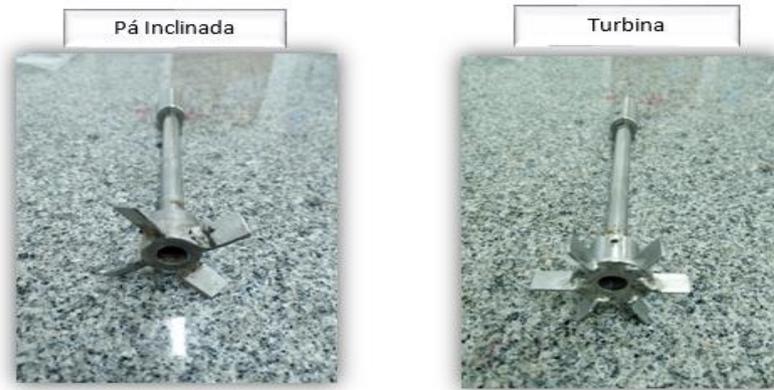
Tabela 2-Processos de agitação mistura e dispersão

Aplicação	Processamento	
	Físico	Químico
Líquido-sólido	Suspensão	Dissolução
Líquido-gás	Dispersão	Absorção
Líquido imiscíveis	Emulsão	Extração
Líquido miscíveis	Mistura	Reação
Movimentação de fluido	Bombeamento	Transferência de calor

Fonte: Nagata, 1975

A mistura de líquidos miscíveis é um dos processos mais utilizado pelas indústrias, pois pode promover uma mistura homogênea entre dois líquidos ou desencadear reações químicas entre dois materiais em estado líquido (JUNIOR et al., 2012a). Nesse tipo de processo é fundamental a escolha de impelidores dependendo do tipo de reação podem ser classificados como naval, pá (reta ou inclinada) e turbina figura 2.

Figura 2-Illustração dos impelidores tipo pá inclinada e turbina



Fonte: Elaborado pelo autor., 2019

O impelidor naval é mais adequado para fluidos pouco viscosos e normalmente são utilizados em processos de bombeamento, já o tipo pá e turbina são aplicadas em processos de misturas de líquidos viscoso e geram componentes de velocidades radiais e tangenciais sendo utilizados em processos de suspensão de sólidos e transferência de massa respectivamente (JUNIOR et al., 2012b)

A agitação é fundamental no processo de obtenção do colágeno auxiliando na movimentação das partículas e na reação do processo, mais no entanto apenas a agitação não faz a diferença tem que ser criado condições de extração para tal, controle de pH, velocidade de rotação, e temperatura.

Existem diferentes métodos de extrações de colágeno no entanto o mais comum utiliza soluções ácidas/alcalinas e Hidrólise enzimática. Estes métodos proporcionam a eliminação das ligações cruzadas das cadeias polipeptídicas, aumentando a quantidade de colágeno solúvel, vale salientar que se a hidrólise ou extração for muito vigorosa, o produto final pode ser uma proteína degradada, estando mais próximo de uma gelatina do que das verdadeiras características de um colágeno (OPCAOFENIX., 2012).

A extração ácida e alcalina (NaOH) é mais ativa, pois requer melhor controle de temperatura, devido ao uso de elevados temperaturas chegando 75°C, enquanto a extração ácida e enzimática requer reagentes químicos como, ácido acético, pepsina e NaCl (HUANG et al., 2016). O pré-tratamento químico faz a remoção de cálcio, gordura e o máximo de impurezas sem que a proteína se desnature (OLIVEIRA., 2011)

Na extração do colágeno pelo método alcalino, a matéria prima é submetida a um pré- tratamento com pH básico por várias semanas tendo uma transformação lenta da estrutura do colágeno. No tratamento ácido, a matéria-prima é imersa em solução ácida à temperatura controlada, ocorrendo a penetração da solução na matéria prima promovendo uma expansão de duas a três vezes o seu volume inicial, dando o processo de clivagem das ligações não covalentes inter e intra moleculares (FERREIRA., 2013). Já na extração pelo método enzimático tem-se a utilização de diferentes enzimas tal como a pepsina, tripsina e collagenase. A pepsina é a mais utilizada na extração de colágeno e pode atuar isolada após uma extração prévia do colágeno com ácido acético ou em conjunto com a solução de ácido acético, gerando um colágeno solúvel com pepsina PSC (SILVA., 2016).

A tabela 3 apresenta os métodos de extração e o rendimento do colágeno de peixes superiores a 10%. Segundo Angele e colaboradores (2004) o rendimento é influenciado de acordo com as variações das espécies e das suas diferentes ligações cruzadas de fibrilas de colágeno.

Tabela 3-Rendimento e método de extração de colágeno (*ASC - Método Ácido-Solúvel e PSC - Método Pepsina-Solúvel) em diferentes espécies.

Espécies	Tecido	Método de extração*	Rendimento (%)
<i>Sebastes mentella</i>	Pele	PSC	92,20
<i>Hypophthalmichthys nobilis</i>	Bexiga	PSC	59,00
<i>Doryteuthis singhalensis</i>	Pele	ASC	56,80
<i>Rachycentron canadum</i>	Pele	ASC	35,50
<i>Ictalurus punctatus</i>	Pele	PSC	28,80
<i>Lates calcarifer</i>	Bexiga	ASC	28,50
<i>Ictalurus punctatus</i>	Pele	ASC	25,90
<i>Doryteuthis singhalensis</i>	Pele	PSC	24,60
<i>Oreochromis niloticus</i>	Pele	PSC	21,80
<i>Lates calcarifer</i>	Pele	ASC	15,80
<i>Rachycentron canadum</i>	Pele	PSC	12,30
<i>Thunnus albacares</i>	Bexiga	PSC	12,10

Fonte: Adaptado de Oliveira et al., 2017c.

Existe uma necessidade urgente de fontes de colágeno segura com ausência de transmissão de patógenos. A extração de colágeno através de resíduos de pescado é mais segura em comparação à extração realizada a partir de resíduos de bovinos e suínos pois apresentam ausência de transmissão de patógenos, não ocorre citotoxicidade e apresenta abundância de matéria prima (pele, escamas, barbatanas, bexiga natatória, ossos, espinha e músculos (ZHRANI., 2011).

3.5. Mercado de Pescados

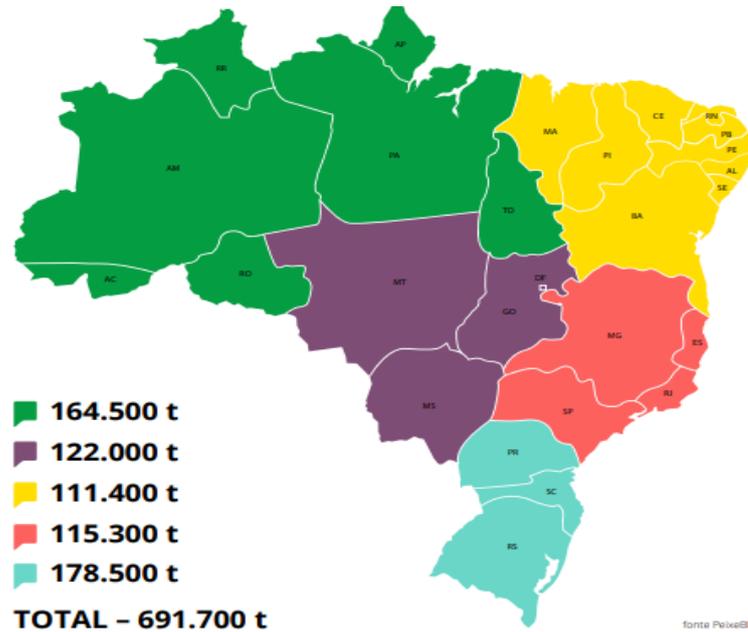
A pesca é a atividade que se baseia na captura de recursos pesqueiros do ambiente aquático, onde a aquicultura é um cultivo, que é normalmente realizado em um espaço controlado e climatizado para organismos aquáticos, como moluscos, peixes, crustáceos, algas, répteis e qualquer espécie aquática que tenha um valor econômico e produtivo. A atividade produtiva da pesca se divide em: piscicultura (criação de peixes); carcinicultura (criação de camarões); ranicultura (criação de rãs); malacocultura (criação de moluscos, ostras e mexilhões); algacultura (cultivo de algas) e outras espécies com menor apelo comercial, tais como a quelonicultura (criação de tartarugas) e a criação de jacarés (SCHULTER & FILHO., 2017).

Segundo o relatório da FAO (2018), a produção mundial de pescado atingiu a marca de 171 milhões de toneladas, com 80,37 milhões de toneladas provenientes da aquicultura sendo carpa a espécie de peixe que lidera as três primeiras posições do ranking, seguida pela tilápia do nilo que ocupa a quarta posição de espécie de peixe mais cultivado, contribuindo com pouco mais de 4,5 milhões de toneladas.

No Brasil, o consumo de pescado chega a 14,50 quilos por habitante/ano de acordo com o levantamento em 2013, ultrapassando assim o consumo mínimo 12 quilos por habitante/ano recomendado pela OMS (MPA., 2013). Segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS), o pescado é a proteína animal mais saudável e consumida do mundo, responsável por 50% do que é consumido pela população mundial.

O mercado brasileiro de pescado da Piscicultura teve um crescimento de 8% em 2017, terminando o ano com a produção de 691.700 toneladas de peixes cultivados como ilustra na (figura 3).

Figura 3-Produção de pescado no Brasil por região em toneladas



Fonte: Peixe BR.,2018

De acordo com a Associação Brasileira de Piscicultura (PEIXE BR), 2018 o estado de Paraná tem apresentado a maior produção de pescado obtendo 112 mil toneladas, equivalente a um aumento de 19,3% em relação a 2016, isto devido aos investimentos feitos por cooperativas importantes, como Copacol e C.Vale. Em segundo lugar está Rondônia com 77 mil toneladas e crescimento de apenas 2% em terceira posição continua com São Paulo que atingiu a produção de 69.500 toneladas, com um aumento de 6,3% sobre o ano anterior. A quarta posição no ranking nacional permanece com Mato Grosso que cresceu 3,5% em 2017, atingindo 62.000 toneladas, porém com potencial para grande desenvolvimento a médio prazo. Santa Catarina manteve-se na 5ª posição, com produção de 44.500 toneladas de peixes cultivados em 2017.

O estado de Alagoas obteve uma produção de 2540 toneladas de tilápia, 897 toneladas de espécies nativos e 63 de outras espécies correspondendo no total de 3500 toneladas de pescado em 2017(PEIXE BR., 2018).

Segundo a FAO, (2011) a aquicultura será o setor produtor de alimentos que mais crescerá no mundo, pelo fato das atividades produtivas serem praticadas em vários países, e terem um importante papel na renda de muitas famílias e

apresentarem teor e qualidade de proteínas animal, com relevância na segurança alimentar (FAO., 2011a).

O Brasil dispõe de grande potencial para o crescimento no mercado pesqueiro, tanto por meio das atividades da pesca como também da aquicultura, gerando novos negócios, empregabilidade e melhoria na renda (MONTE., 2016). Segundo a Embrapa (2017) a aquicultura brasileira comercial é diversificada, porém o maior volume de cultivo é comercialização com um pequeno número de espécies (tabela 4).

Tabela 4-As espécies mais comuns produzidas no Brasil, por região

Região Norte	Tambaqui, Pirarucu e Pirapitinga
Região Nordeste	Tilápia e Camarão marinho
Região Centro-Oeste	Tambaqui, Pacu e Pintado
Região Sudeste	Tilápia, Pacu e Pintado
Região Sul	Carpa, Tilápia, Jundiá, Ostra e Mexilhão

Fonte: EMBRAPA, 2017.

Segundo levantamento inédito da Associação Brasileira da Piscicultura (PEIXE BR) (2018) a tilápia representa 51,7% da Piscicultura nacional, com 357.639 toneladas em 2017, na segunda posição se a categoria de peixes nativos liderado pelo Tambaqui com 302.235 toneladas que representam 43,7% produção brasileira.

3.6. Espécies de Tilápia

A espécies de tilápias variam em três gêneros *Tilapia*, *Sarotherodon* e *Oreochromis*, sendo o último mais conhecido e mais cultivado. No gênero *Oreochromis* se destaca quatro tipos de tilápia diferentes: Tilápia Nilótica ou do Nilo (*Oreochromis niloticus*), Tilápia de Moçambique (*Oreochromis mossambicus*), Tilápia Azul ou Tilápia Áurea (*Oreochromis aureus*) e a Tilápia de Zanzibar (*Oreochromis urolepishornorum*) (OLIVEIRA., 2007a)

A figura 4 representa a Tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) que é a espécie mais cultivada e comercializada no Brasil, apresentando inúmeras vantagens para seu cultivo em cativeiro, como grande capacidade de adequar-se a diversos sistemas de produção, rápido crescimento de 4 a 7 meses, dependendo da temperatura, apresenta facilidade na reprodução e carne de excelente qualidade, para o consumo. (FITZSIMMONS., 2000).

Figura 4-Illustração da Tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*)



Fonte: FITZSIMMONS., 2000.

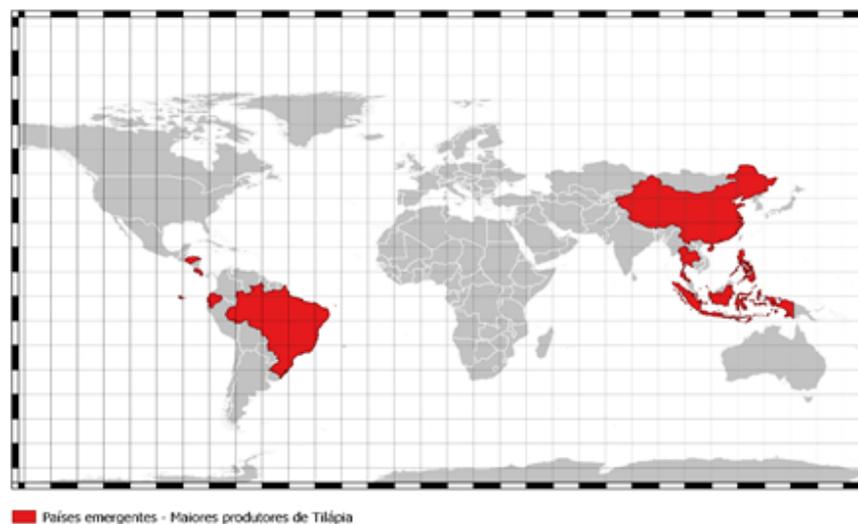
De acordo com Barroso e colaboradores (2015) durante as décadas de 40 e 50 houve uma distribuição mundial significativa da tilápia com o intuito de promover o cultivo de subsistência em países subdesenvolvidos. O peixe foi escolhido devido à adaptabilidade e à alimentação rústica. A história da distribuição da tilápia no Brasil, segundo os autores, inclui a introdução da *Tilapia Rendalii*, importada do Congo Belga, atual República Democrática do Congo, na década de 50 para o povoamento dos reservatórios hidrelétricos da Light São Paulo. A partir de então, outras espécies de origem africana foram trazidas com o objetivo de repovoar, incluindo as espécies *Oreochromis Angolensis*, *Oreochromis Aureus* e *Oreochromis Urolepus Hornorum*, beneficiando a pesca artesanal com nível de segurança alimentar

Logo após esse período, o Departamento Nacional de Obras Contra a Seca (DNOCS) em 1971 implementou a espécie Tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) nos reservatórios públicos da Região Nordeste, tornando-se com o passar dos anos a espécie de peixe mais popular da região. A Tilápia do Nilo, apresenta hábito alimentar fitoplanctófago, mas também se adapta muito bem a rações sintéticas e artesanais que tem como base os subprodutos da agropecuária (OLIVEIRA., 2007b).

A criação de tilápia é caracterizada pela facilidade na manutenção da qualidade da água no criadouro, desfrutando de um ambiente com condição climática favorável. A tilápia é a espécie de peixe que mais apresenta adaptabilidade quando criada em cativeiro devido a sua alta capacidade de resistir a patógenos, proporcionando tolerância a variados cultivos em ambientes hostis e estressantes, tornando-se a espécie preferida na piscicultura brasileira, obtendo uma participação de 38% na produção total de peixes oriundos desse processo. (JÚNIOR., 2008).

Os maiores produtores de tilápia são os países emergentes, que são países subdesenvolvidos em situação de crescimento, justificando a afirmação de Barroso e colaboradores, (2015a) quando afirmaram que durante décadas a cultura do peixe foi incentivada em países sob situação socioeconômica inferior. A figura 5 representa os países emergentes considerados grandes produtores de peixes primeiro é a China, depois Brasil, Indonésia, Costa Rica, Filipinas, Tailândia, Equador e Honduras (YUE et al., 2016)

Figura 5- Países emergentes na produção da tilápia



Fonte: Elaborado pelo autor., 2018

Desde 2004, que a produção nacional aquícola principalmente da tilápia está apresentando crescimento anual de 14,2%, destacando-se como uma atividade que procede na cadeia produtiva de alimentos (SCHULTER & FILHO, 2017a). Apesar do alto sucesso na cadeia produtiva o processo de filetagem da tilápia do nilo e gera alta carga de resíduo orgânico desperdiçado sem qualquer tipo de tratamento (ALVES, 2016a).

3.7. Resíduos Pesqueiros

Em paralelo ao aumento do consumo de pescado se tem uma variedade de resíduos sólidos gerados pela indústria de processamento de filé, tais como cabeça, cauda, escamas, barbatanas, bexiga natatória, cartilagens, vísceras e pele, representando mais de 50% do peso do animal e se tornando um prejuízo econômico e ambiental quando descartado inadequadamente (OLIVEIRA., 2012).

O termo resíduo refere-se às sobras e aos subprodutos do processamento dos alimentos que são de valor relativamente baixo. Não há uma definição para os constituintes dos subprodutos da indústria pesqueira, usualmente, fala-se em vísceras, cabeça, aparas, ossos e pele. Deve-se observar que os subprodutos pesqueiros possuem valiosas proteínas e frações lipídicas, bem como vitaminas e sais minerais (RUSTAD, 2003a).

Nas indústrias de pescado, o filé de tilápia é o item de maior valor econômico, e o rendimento varia de acordo com o tamanho dos peixes e com o domínio tecnológico de quem processa. Assim o rendimento pode atingir entre 30 e 40% do peso do animal sendo o restante considerado resíduos e sem valor comercial (FELTES et al, 2010). Desta forma, os resíduos da industrialização da tilápia, que representam 60 a 70% da matéria prima que é atualmente subutilizado ou descartado (MARTONE, 2005).

A cadeia produtiva da piscicultura gera diversos resíduos orgânicos com quantidades e tipo variados dependendo exclusivamente do tipo de processo de industrialização, seja no peixe inteiro ou apenas na produção de filé. A utilização destes resíduos é altamente recomendável do ponto de vista ambiental devido à alta carga de material orgânica que pode ser depositado no meio ambiente, evitando assim a geração de problemas para o ecossistema. (MOLINARI, 2014).

Um dos maiores impactos provocados por esses resíduos sólidos orgânicos vem do fato desse material entrar em processos de fermentação, no qual gera ácidos orgânicos como o chorume que é um líquido de elevada demanda bioquímica de oxigênio (DBO), além disso esse resíduo podem realizar a proliferação de vetores e do mau cheiro (DECKER, et al, 2016).

Nunes e colaboradores (2013) relata que a grande quantidade de resíduos orgânicos, produzidos nas diversas etapas da cadeia produtiva da pesca, é constituída de matéria-prima de alta qualidade, que poderiam ser utilizada para produção de diversos subprodutos, tais como o curtimento da pele, produção de rações proteinadas e de alguns óleos.

De acordo com Rustad (2003b) o aproveitamento de subprodutos não é novidades. Há anos países do Norte da Europa fazem uso dos vários subprodutos para vários propósitos, dentre eles, a confecção de roupas, sapatos e bolsas, entre outros materiais. Assim a contínua pesquisa e o desenvolvimento de novas tecnologias para utilização desses subprodutos são necessários (ALFARO, 2008).

As vísceras, escamas e o esqueleto, por exemplo, são matérias-primas para fabricação das farinhas, silagens e óleos de peixe, comumente empregados na alimentação animal. A carcaça contendo carne residual da filetagem, por sua vez, é submetida a processos para obtenção da polpa de peixe, principal ingrediente na fabricação de empanados e embutidos, muito apreciados na alimentação humana e com excelente valor agregado. A elaboração de couro, a partir das peles residuais do filetagem de pescados, representa hoje uma fonte alternativa de renda que pode servir de matéria-prima para a fabricação de carteiras, bolsas, confecções de vestuários, entre outros artefatos (SOUZA, et al, 2003).

Assim alternativas para aproveitar rejeitos de pescados tem sido estudado com o intuito de produzir hidrolisados proteicos a partir da extração de colágeno e gelatina, devido a tendência de utilização destas proteínas na substituição aos agentes sintéticos nos mais diversos processos industriais, permitindo maior valorização dos subprodutos aumentando o faturamento destes e contribuindo para uma produção mais limpa e sustentável (BUENO et al,2011; PRESTES et al, 2013d).

Segundo Arruda (2004), a necessidade de montar um sistema de aproveitamento dos resíduos de alimentos industrializados é de extrema importância econômica, não somente ambiental mais também para o desenvolvimento de novos produtos que utilizem resíduos líquidos e sólidos no preparo.

4. METODOLOGIA

4.1. Local do Experimento

Os experimentos foram efetuados nos seguintes laboratórios: Centro de Prospecção e Pesquisas Tecnológicas CENPROPET vinculado ao Centro de Tecnologia - CTEC, Laboratório de Tecnologia em Bebidas e Alimentos (LTBA) e Laboratório de Metabolismo e Proteômica (LAMP) da Universidade Federal de Alagoas – UFAL.

4.2. Os Resíduos da Tilápia e Pré-Tratamento.

A pele da Tilápia do Nilo é constituída principalmente por duas camadas teciduais, a primeira a epiderme onde localiza as células epiteliais pavimentosas, dispostas em camadas que contêm células produtoras de muco e de pigmentos e a segunda derme sendo formada por uma espessa camada de tecido conjuntivo fibroso denso com fibras de colágeno elásticas e vasos sanguíneos (SOUZA & SANTOS., 1997).

Segundo Figueiredo (2015a) a composição centesimal da pele de tilapia é 70,51 % de Umidade, 9,31% Lipídios, 26,30% de Proteínas e 0,44% Cinzas, Autores como Franco e colaboradores (2013) obtiveram valores de umidade 67,14%, lipídios 1,96%, proteínas de 29,08% e Cinzas 1,82%.

Figura 6-Descarne e lavagem da pele



Fonte: Elaborado pelo autor., 2019

A pele de tilápia, empregada neste estudo foi obtida no mercado da produção de Alagoas e toda a massa de pele estudada passou por um processo de descarne e

círculos de lavagem em água corrente, em seguida, foram conservados em geladeira até o início do tratamento como representado na figura 6.

4.3. Processos de Extração e Purificação do Colágeno

4.3.1. Processo de agitação e mistura

No processo de extração do colágeno hidrolisado foi utilizado um sistema de agitação levando em conta dois parâmetros, o tipo de impelidor e a velocidade de rotação à qual a reação foi submetida para promover a mistura e hidrólise tabela 5 no tempo de 2h.

Tabela 5-Representação dos Parâmetros a serem analisados

Parâmetros do processo		
Tipo de Impelidor	Turbina	Pá inclinada
Velocidade de Rotação	200rpm	400rpm

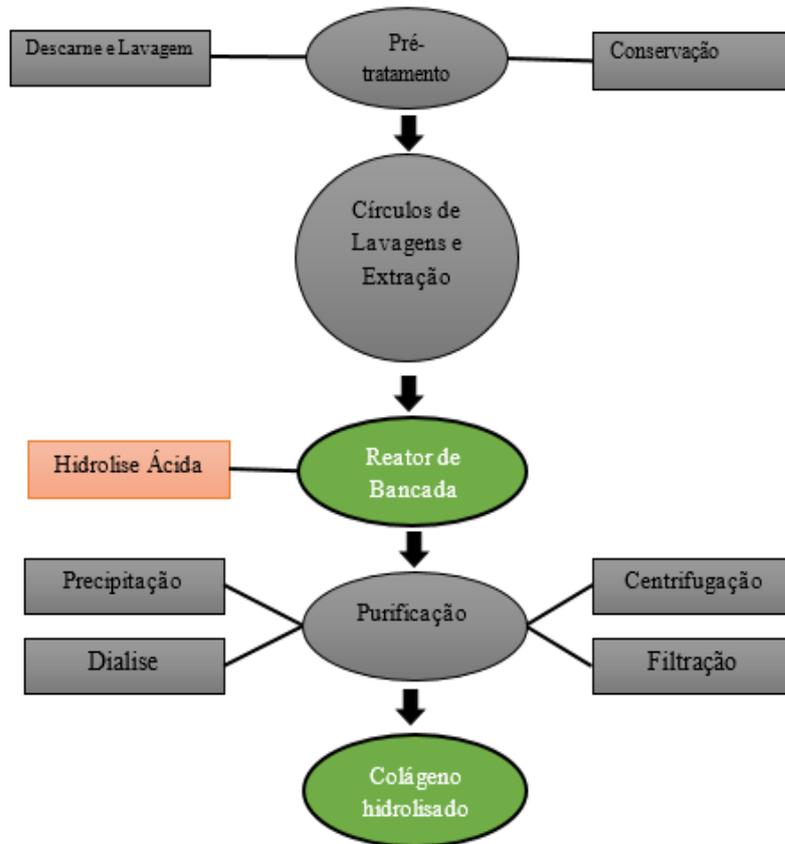
Fonte: Dados do autor, 2019

4.3.2. Extração do colágeno pelo método de ácido

A metodologia de extração do colágeno teve como base o trabalho realizado por Montero e Gómez-Guillén (2000), sendo aplicado algumas alterações no processo. Na extração foram utilizadas cem (100) g de pele de peixe, que foram então tratadas com três soluções diferentes já pré-definidas que foram uma solução de (NaCl) $0,8 \text{ mol L}^{-1}$ para remoção do excesso de água na pele, e algumas proteínas superficiais, uma solução de (NaOH) $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ para remoção parcial da gordura na pele e demais impurezas, a fim de cada processo de lavagem a mostra foi lavada com água destilada e acetato de sódio sobe agitação lenta para precipitação de outras proteínas não colagenosas. Para retirada de gorduras totais o extrato foi submetido a uma solução de álcool etílico 10% por um tempo de 12h a 4°C temperatura.

Para obtenção do hidrolisado a amostra foi processada em um reator em batelada encamisado com fluxo refrigerante de mistura utilizando dois tipos de impelidores (Turbina e Pá) e uma solução de ácido Acético (HAc) $0,3 \text{ mol L}^{-1}$ iniciando o processo de desacoplamento ou quebra da cadeia tecidual a qual é composta também por colágeno e o início da hidrólise.

Figura 7-Fluxograma do processo de extração, purificação do colágeno



Fonte: Elaborado pelo autor., 2019

4.3.3. Purificação precipitação e diálise do extrato proteico

De acordo com Zeugolis e Raghunath (2011) a purificação do colágeno pode ser realizada através de precipitação salina, diálise ou métodos cromatográficos. A purificação foi realizada a partir do método de Seifter e Gallop (1963) com algumas modificações. Para as etapas de purificação, foi dada prioridade a processos mais simplificados com o propósito de diminuir os custos na obtenção desse produto. Primeiramente foi realizado círculos de lavagem com acetato de sódio $0,5 \text{ mol L}^{-1}$ em cada processo de extração. O conteúdo proteico hidrolisado foi filtrado a vácuo utilizando funil de Büchner e a massa do filtrado foi precipitada com solução de acetato de sódio $0,5 \text{ mol L}^{-1}$ e centrifugada à 10000 rpm durante 5 minutos a 4°C . O sobrenadante foi descartado contendo outras proteínas não colagenosas e a massa na centrífuga foi ressuspensa no tampão da hidrólise (HAc).

4.3.4. Precipitação com sulfato de amônio

A precipitação salina de proteína foi realizada utilizando o método de Green e Hughes (1955). Da amostra foi coletado 5ml para o processo de precipitado com

sulfato de amônio. Cada etapa da precipitação é composta pelo cálculo da quantidade de sal a pesar. Diferentes volumes de extratos pedem quantidades proporcionais que respeitem as seguintes proporções tabela 6:

Tabela 6- Fracionamento salino

Faixa de saturação	Massa de sulfato de amônio
0-20%	106
20-40%	113
40-60%	120
60-80%	129

Fonte: Green e Hughes., 1955.

Baseado nessas proporções da tabela 6, através de uma regra de três simples, se obtém a quantidade de sal a ser pesada e após a pesagem, o extrato será colocado em gelo sob agitação continua onde o sal pesado para aquela fração será adicionado aos poucos até que seja totalmente solubilizado. Ao final da adição de sal, o extrato permanece em geladeira por um período de 1h e centrifugado, logo após a centrifugação o precipitado é suspenso em tampão e o sobrenadante é retirado para seguir para a próxima faixa de saturação, repetindo o procedimento.

4.3.5. Dialise

O processo de diálise é simples porém um pouco demorado, podendo levar várias horas até se atingir o nível de purificação desejado (Baker, 2004). O processo de diálise teve início após o processo da precipitação e as porções de proteínas precipitadas foram inseridas em uma membrana de diálise e vedadas as extremidades. A membrana então contendo a amostra foi imersa em um béquer de 1000 mL com água destilada, sob agitação magnética por um período de 24h para melhor retirada de sal e ácido acético.

4.4. Avaliação da Pureza da Proteína

4.4.1. Eletroforeses em gel de poliacrilamida com Dodecil Sulfato de Sódio (SDS-PAGE)

Para avaliação do grau de pureza da solução proteica obtida, foi realizado experimento de eletroforese empregando SDS-PAGE de acordo com Champasri;

Champasri; Woranam, (2015) com algumas modificações, utilizando o gel separador na concentração de 12% (Tabela 7). 15 µL das amostras de proteínas foram misturadas com 5 µL do tampão de amostra contendo Tris HCl pH 6.8 a 62.5 M, SDS 2%, glicerol 10%, β-mercaptoetanol 5% e azul de bromofenol 0,001% e aquecidas por 5 minutos antes de serem levadas ao gel. A eletroforese foi realizada com tampão de corrida (Tris 0,025 M, glicina 0,192 M, SDS 0,1%) a 120 V até o final do gel separador. Em seguida, o gel foi mergulhado na solução corante contendo 0,15% Azul de Coomassie Brilhante R-250 em 50% de etanol e 10% de ácido acético (p/v) *overnight*. No dia seguinte, o gel foi descorado com solução descorante contendo 10% de ácido acético e 50% de metanol (v/v), e a proteína foi identificada neste experimento.

Tabela 7-Composição do gel de resolução 12%

Soluções do Gel Inferior	Gel de 12% (q.s.p)	Soluções do Gel Superior	
Bis-Acrilamida 30%	2.000 µL	Bis-Acrilamida 30%	800 µl
Tris-HCl 2M, pH 8.8	937.5 µL	Tris-HCl 0.5 M, pH 6.8	1000 µl
SDS 1%	500 µL	SDS 1%	400 µl
Persulfato de Amônia	250 µL	Persulfato de Amônia	200 µl
TEMED 1%	250 µL	TEMED 1%	200 µl
Água deionizada	1062,5 µL	Água deionizada	1.400 µl
Total	5 mL	Total	4 mL

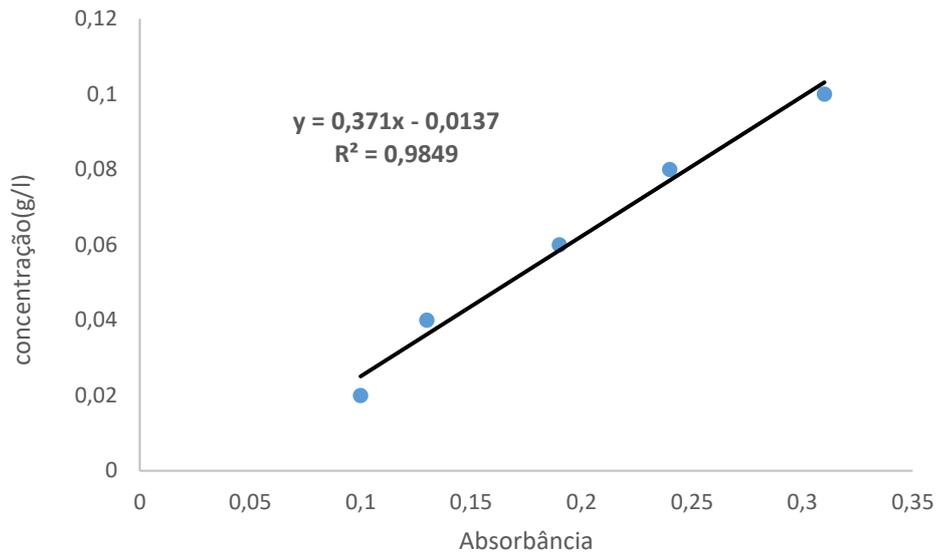
Fonte: SILVA et al., 2015

4.5. Quantificação de Proteína-Método de Bradford

A quantificação de proteína foi determinada segundo método de Bradford (1976). No preparo do reagente, dissolveu-se 102,4 mg de Coomassie Brilliant Blue G-250 em 50 mL de etanol 95%, a solução foi agitada durante 60 minutos, seguido de adição de 100 mL de ácido fosfórico 85%. A solução obtida foi completada para 1 L com água deionizada e manteve-se sob agitação durante 10 minutos. Após duas filtrações em papel de filtro, o reagente de Bradford foi armazenado e protegido da luz. A Figura (8) representa a construção da curva de calibração de proteínas construída empregando-se albumina de soro bovino (1mg/mL) como padrão na faixa

de concentração de 0,02g/L à 0,12g/L. Adicionou-se 2500 µL de reagente de Bradford em cubeta de 3 mL, seguido de 100 µL de solução padrão de albumina, incubando por 5 minutos. A leitura de absorvância a 595 nm foi determinada em espectrofotômetro, utilizando 100 µL de água em lugar de solução padrão para referência.

Figura 8-Curva padrão de reagente de bradford



$$Y = (0,371 * X) - 0,0137 \quad (1)$$

Y=Absorvância; X= Quantidade de proteína

4.6. Avaliações do Rendimento

O cálculo do rendimento das extrações foi realizado a partir da relação entre a massa do colágeno seco e a massa da matéria-prima úmida de acordo com a Equação 2:

$$\text{Rendimento(\%)} = \frac{\text{Massa do colágeno}}{\text{Massa da materia prima}} \times 100 \quad \text{Eq. (2)}$$

4.7. Espectroscopia no Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR)

A espectroscopia é um método analítico que estuda a interação de radiações eletromagnéticas com moléculas ou partículas. Os átomos que formam as moléculas possuem frequências específicas e vibração, que variam de acordo com a estrutura e composição da amostra que para apresentar tal frequência na espectroscopia no

infravermelho, é necessariamente a apresentação de um momento dipolar que a molécula sofra uma variação durante a vibração (CHIA, 1984; LEITE, 2008).

As análises serão conduzidas utilizando espectrômetro (Perkin Elmer modelo Spectrum 400 Series) e o software Spectrum Search Plus for Spectrum V6. Esta técnica baseia-se na incidência de um laser infravermelho sobre a amostra. Desse modo, as ligações formadas pelos elementos químicos que compõem a amostra vibram e rotacionam em diferentes comprimentos de onda, de modo que permite medir o comprimento de ondas geradas. Diferentes comprimentos de onda indicam diferentes agrupamentos químicos, visto que estes apresentam frequências específicas de vibração, dessa forma, quantifica-se uma propriedade física de absorção ou de transmissão.

5. RESULTADOS E DISCUSÃO

5.1. Pré-teste do Ácido Acético (HAc)

Foi realizado uma análise quantitativa previa em relação à concentração de HAc em função da quantidade de proteína bruta obtida sem agitação. Na análise foi utilizada a concentração de 0,3 M num periodo de 3h com coletas a cada 30 minutos, sendo feitas em duplicata. A utilização do ácido acético na extração do colágeno se deve ao fato de ser um ácido orgânico, que segundo Alexandre e colaboradores (2017) o colágeno apresenta alta solubilidade e custo relativamente baixo podendo ser pouco poluente.

A tabela (8) demonstra os valores encontrados na quantificação de proteína na concentração de HAc a 0,3 M sem agitação, tendo a maior quantidade de extrato de colágeno em torno de 18,77% num tempo de 3h.

Tabela 8-Tabela de HAc em função da quantidade de proteínas

Tempo (min)	Absorbância		Quantidade de proteína (g/L)		Rendimento em (%)	
	Amostra 1	Amostra 2	Amostra 1	Amostra 2	Amostra 1	Amostra 2
30	0,096	0,074	12,97	9,87	12,97	9,87
60	0,103	0,102	13,90	13,78	13,90	13,78
90	0,097	0,104	13,10	14,05	13,10	14,05
120	0,111	0,094	15,13	12,70	15,21	12,70
150	0,102	0,113	13,78	15,26	13,75	15,26
180	0,109	0,139	14,72	18,77	14,17	18,77

Fonte: De propia autoria., 201

. Alguns trabalhos realizados por Wang (2008) demonstram a importância do ácido acético no rendimento do colágeno quando aplicado para o processo de extração onde obteve 19,7 % de rendimento. Já Sujithra e colaboradores obtiveram valores um pouco maior em torno de 22% na extração de colágeno utilizando a espécie de peixe *Oreochromis niloticus*. Souza (2004), relata na sua pesquisa que a concentração de proteína de colágeno na tilápia-do-nilo é de 27,4%, estando próximo dos valores obtidos nesse experimento.

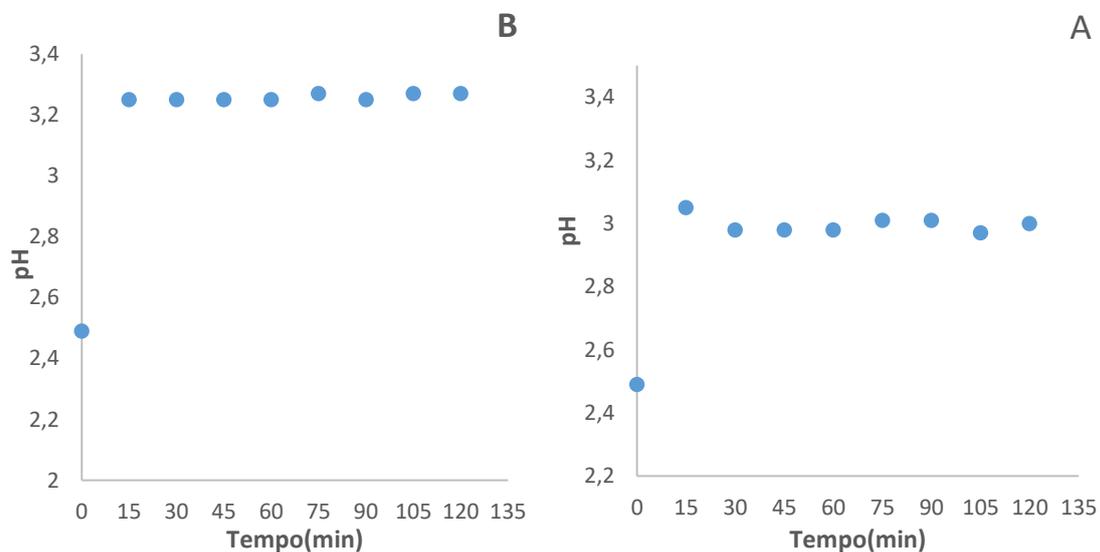
Na tentativa de atingir valores superiores aos já descritos, uma abordagem foi a inserção do uso de impelidores, bem como, avaliação da velocidade de rotação, acoplado a um reator de batelada encamisado com fluxo refrigerante.

5.2. Processo de Agitação

Entre as técnicas convencionais de rompimento celular, destaca-se a agitação mecânica. Neste trabalho foi proposto a agitação mecânica utilizando dois tipos diferentes de impelidores, o tipo turbina e pá inclinada com variação da velocidade de rotação entre (200-400 rpm) levando em conta o pH da solução e a quantidade de proteína gerado no processo como marcadores do rendimento.

Os gráficos (A e B) da figura (9) representam a reação da hidrólise em função da implementação do processo com os impelidores tipo turbina e pá inclinada na velocidade de rotação de 200 rpm demonstrando eficiência no processo de extração do colágeno levando em conta o fator da estabilidade do pH na solução da mistura.

Figura 9-Representação gráfica dos impelidores tipo turbina(A) e pá inclinada (B) em relação ao pH da reação



Fonte:

Elaborado pelo autor., 2019

O pH da reação usando o impelidor turbina teve um crescimento rápido nos primeiros 15 min atingindo o valor máximo de 3,05, já apresentando característica de homogeneização. Após esse período a reação se manteve com pequenas variações de pH (0,03) a cada 15 minutos.

No tempo de 75 minutos foi observado diminuição no valor de pH e pequenas oscilações, indicando assim o final da hidrólise. Foi observado comportamento similar no impelidor pá implinado diferenciando apenas no valor máximo atingido pelo pH 3,25.

De acordo com o estudo de Harnedy e Fitzgerald (2013), ao avaliarem o tempo de agitação entre 30 a 180 min para extração de proteínas identificaram que após 60 min de agitação o percentual de extração se tornava constante, sugerindo este tempo como o melhor para extração, o mesmo foi constatado no experimento realizado neste processo de extração. Esse final da hidrólise pode ser comprovado através da tabela (9) desmostrando a descida no valor da absorbância, que interfere diretamente no rendimento da concentração de proteína em solução.

Tabela 9-Representação de valores de pH em função da Absorbância da proteína

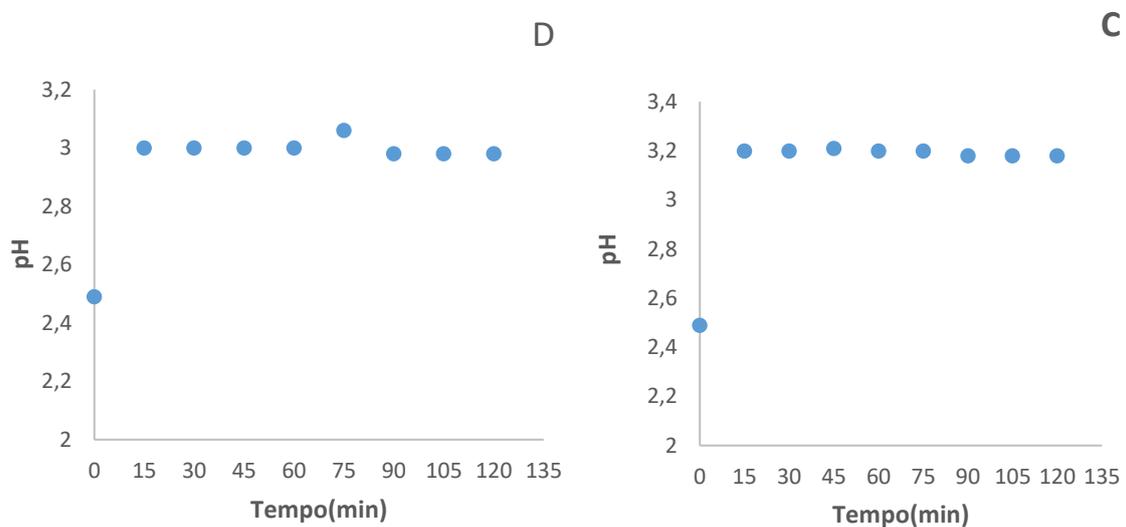
Tempo (min)	pH		Absorbância	
	Turbina	Pá	Turbina	Pá
15	3,05	3,25	0,300	0,239
30	2,98	3,25	0,337	0,330
45	2,98	3,25	0,365	0,376
60	2,98	3,25	0,453	0,432
75	3,01	3,27	0,499	0,422
90	3,01	3,25	0,433	0,423
105	2,97	3,27	0,386	0,407
120	3,00	3,27	0,381	0,394

Fonte: Elaborado pelo autor., 2019

Mohamad e colaboradores (2013), relatam que a relação entre proteína e velocidade de agitação é proporcional até que o rendimento ótimo seja obtido, Alcançaando esse parâmetro a velocidade da agitação se torna desvantajoso pois permite a diminuição no rendimento da proteína devido ao alcance de velocidade extremas de agitação e redução no número de colisões de soluto-solvente. Durante o processo de agitação, o comportamento do impelidor tipo pá em relação ao pH foi mas uniforme como demonstra o gráfico (9) porém a concentração de proteína foi maior no impelidor tipo turbina.

Foram analisados a 400rpm os impelidores tipo pá e turbina tendo mostrado maior rendimento nesta rotação e reforçando a concordância com o que foi relatado por Mohamad e colaboradores, (2013a) sobre a proporcionalidade quando se aumenta a velocidade aumenta também o rendimento. Os gráficos (C e D) a 400 rpm apresentaram o mesmo comportamento do que em rotação a 200 rpm em relação ao pH. No entanto o rendimento na rotação de 400 rpm foi maior que a 200 rpm utilizando o impelidor tipo turbina.

Figura 10-Representação gráfica dos impelidores tipo turbina (D) e pá inclinada (C) em relação ao pH da reação



Fonte:Elaborado pelo autor., 2019

O estudo mostrou-se importante para determinar uma velocidade de agitação adequada fornecendo um ambiente de extração propício para autonomizar o processo de extração e melhorar o rendimento do colágeno hidrolisado extraído. De acordo com Wang e colaboradores (2013) a eficiência da extração pode ser aumentado quando combinados a diferentes técnicas de rompimento celular, exemplo técnicas de ultrassom.

5.3. Rendimento do processo

Neste trabalho a extração do colágeno a partir da pele de tilápia se mostrou positivo, retificando assim que é possível a extração de colágeno a partir da pele de peixes de forma simples e menos dispendioso, utilizando método Ácido-Base assim concordando com o trabalho realizado por Montero e Gómez-Guillén (2000a), em que ele obteve a extração desta mesma proteína utilizando método simples de extração

tal como banhos em reagentes filtrações e precipitação. Com a aplicação dos impelidores e rotação, detectou-se um ponto ótimo de produção de proteína seguido de diminuição com o aumento das velocidades de agitação.

Os melhores rendimentos da extração do colágeno hidrolisado sobre agitação foi a 400rpm com o tipo turbina 71,06% e tipo pá inclinada 63,24%, de acordo com a tabela (10). A agitação se mostrou um fator fundamental no rendimento do colágeno proporcionando uma melhor mistura e aceleração da reação de hidrólise.

Tabela 10- Rendimento de acordo com a rotação e impelidores

Tipo de impelidor	Velocidade de Rotação (rpm)	Rendimento de Extração (%)
Turbina	200	67,29
Turbina	400	71,06
Pá Inclinada	200	58,18
Pá Inclinada	400	63,24

Fonte:Elaborado pelo autor.,2019

O rendimento do colágeno da pele de peixe mostrou eficiente estando de acordo com o rendimento obtido por Moula Ali e colaboradores (2018) de 81.53% em espécie *Probarbus Jullieni* utilizando o ultrassom no processo. No entanto comparado com o rendimento obtido por Oliveira e colaboradores (2017d) na tabela 10 para espécie de tilápia *Oreochromis niloticus* o rendimento do experimento se mostrou bem superior aos 21,80%, outros autores como Alexandre e colaboradores (2017a) obtiveram 36% em seus estudos.

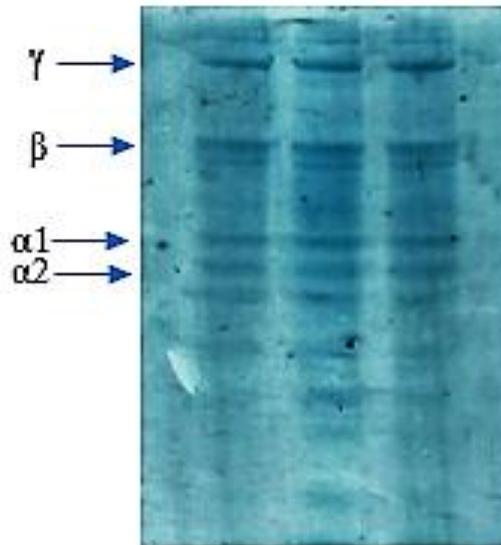
5.4. Pureza do colágeno

A pureza do colágeno foi determinada a partir da eletroforese SDS que permite a separação das moléculas baseada em seu tamanho (massa molecular aproximada de uma cadeia polipeptídica) e mobilidade eletroforética (carga elétrica) (ALBERTS et al., 2004)

De acordo com Caputo (2012) o colágeno padrão mostra bandas extras em tamanho molecular superior, com dímeros de 200 kDa, e trímeros (tropocolágeno) de 300 kDa, o que indicou a presença de ligações cruzadas residuais entre as hélices.

Na figura (11) se tem um gel sds-page da proteína bruta do colágeno hidrolisado sem uma purificação na segunda banda e um purificação parcial na duas laterais. O gel revelou a presença de várias bandas de proteínas juntamente com as bandas respectivas do colágeno tipo I confirmando a presença da proteína na pele de peixe.

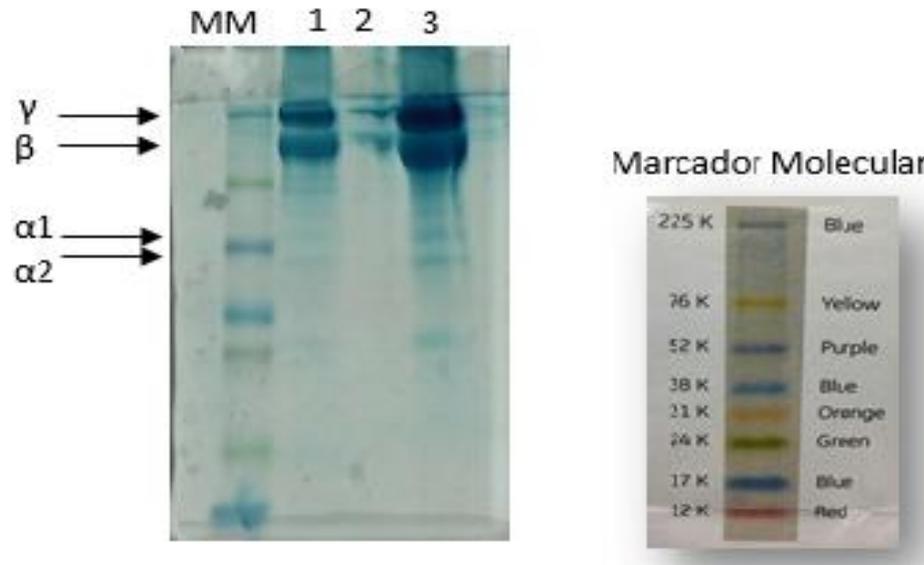
Figura 11-Electroforese em gel de SDS-poliacrilamida a 12% de colágeno hidrolisado bruto da pele de tilapia (*Oreochromis niloticus*).



Fonte: Elaborado pelo autor., 2019

Após a observação no gel foi realizado um purificação na proteína e uma segunda corrida contendo o marcador molecular (padrão de alta MM) e o colágeno comercial hidrolisado. O segundo gel de acordo com a figura (12) revelou as bandas de colágeno do tipo 1 onde foi possível estimar a massa molecular (MM) e a composição das subunidades da amostra.

Figura 12-Leitura no gel das amostras de Colágeno hidrolisado (rotoevaporado) (1); Comercial (2); Colágeno hidrolisado Acida (3)



Fonte: Elaborado pelo autor., 2019

Tabela 11- Representação das bantas e peso molecular de proteína do colágeno

Colágeno Hidrolisado	Representação de Bandas	Peso molecular (kDa)
1-Hidrolisado Acida*(Rotoevaporado)	Gama (γ)	225
	Beta (β)	151
	Alfa ($\alpha 1, \alpha 2$)	79 e 73
2-Hidrolisado Comercial	Gama (γ)	225
	Beta (β)	151
3- Hidrolisado Acida	Gama (γ)	225
	Beta (β)	151
	Alfa ($\alpha 1, \alpha 2$)	49 e 55

Fonte: Elaborado pelo autor., 2019

Segundo os Laboratorios Advanced Biomatrix (2018) a região alfa consiste de duas cadeias $\alpha 1$ e uma cadeia $\alpha 2$ que são distintas nesta região, que apresenta moléculas hidrolizadas e alguns outras proteínas, e as duas cadeias $\alpha 1$ são

sobrepostas e produzem uma banda mais intensa em comparação com a cadeia $\alpha 2$. A região β (beta) é composta por duas bandas superior e inferior que possuem uma cadeia $\alpha 1$ e uma cadeia $\alpha 1$ combinada com outra cadeia $\alpha 2$, respectivamente, apresentam as três cadeias que formam a tripla hélice. A região gama consiste em duas cadeias $\alpha 1$ combinadas com uma cadeia $\alpha 2$, que representam as moléculas de alto peso molecular. As cadeias nas regiões gama e beta são reticuladas covalentemente a uma cadeia adjacente.

Todos os hidrolisados, com exceção do colágeno comercial apresentaram bandas intensas $\alpha 1$, $\alpha 2$, β e γ . O colágeno hidrolisado Acida apresentou duas bandas alfa ($\alpha 1$ e $\alpha 2$) de peso molecular 49 kDa e 55 kDa, uma cadeia beta (β) com peso de 151 kDa que é que caracteriza pela presença das 3 cadeias que formam a tripla hélice, justificando a forma carregada no gel e uma cadeia alfa (γ) de 225 kDa caracterizados com presença de moléculas de elevada massa molar (> 180 kDa) (ZHANG et al., 2009). O colágeno que foi rotoevaporado para retirada do excesso de ácido apresentou bandas de alfa ($\alpha 1$ e $\alpha 2$) de 73kDa e 77kDa respetivamente, já o comercial apenas apresentou cadeia β e γ menos carregados.

Foi observado grande quantidade de cadeias β nas colunas 1 e 3. De acordo com (CARVALHO et al., 2018), isso pode significar que o colágeno obtido era rico em interações inter e intramoleculares.

A presença de uma banda de menor massa na molecular no gel da coluna 3 não identificado, é explicado segundo TOSH (2003) como sendo uma banda de menor intensidade que provavelmente foi formado por ligações covalentes entre os dímeros de colágeno. Caputo (2012a) relata que essas pequenas massas moleculares podem apresentar certas funcionalidades, como atividade antioxidante, quelante, mineral e inibitória da enzima conversora da angiotensina I (ECA).

As subunidades $\alpha 1$ e β são os principais componentes do colágeno, e a cadeia γ mostrou-se bem intenso nas colunas 1 e 3. A cadeia $\alpha 1$ apresenta maior massa molecular em relação a cadeia de $\alpha 2$ tendo um comportamento um pouco mais intenso no gel. De acordo com Kittiphattanabawon e colaboradores (2010) a intensidade de $\alpha 1$ em relação a $\alpha 2$ é um indicio da presença do colágeno do tipo I. Matmaroh et al. (2011) relataram que o colágeno tipo I contém 2 subunidades idênticas de $\alpha 1$ e uma de $\alpha 2$.

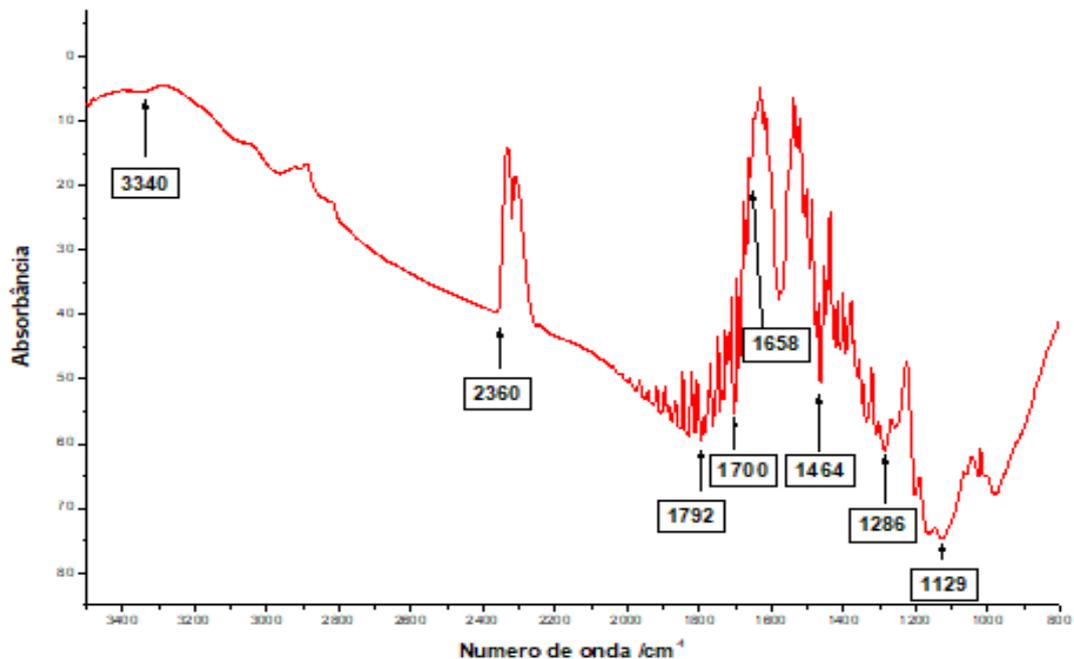
Os resultados encontrados estão em conformidade com os trabalhos descrito por Bova (2016), Caputo (2012c) no que se refere a presenças de bandas de colágeno no gel. No entanto os pesos moleculares são um pouco diferentes da literatura, isso pode ser justificado pelo fato da existência de variados processos de extração e a forma como é tratado o material bem como o tipo de marcador que é empregado nas leituras em géis.

5.5. Espectroscopia de absorção na região do infravermelho(FTIR)

A técnica de espectroscopia no infravermelho está sendo cada vez mais solicitada, devido a obtenção de medidas rápidas, utilizando pequenas proporções da amostra, não exigindo um preparo prévio, apresentando uma leitura sem geração de resíduos e poluentes, com alta detecção de diferentes parâmetros simultânea (FERNANDES, 2015).

Foi realizado a análise por FTIR a fim de caracterizar a estrutura dos principais grupos funcionais presentes no colágeno hidrolisado. Apenas as bandas mais relevantes para o processo de caracterização do colágeno foram analisadas (Tabela 13). Na Figura (13) representa o espectro obtido após a análise de FTIR.

Figura 13-Espectro de FTIR para o colágeno hidrolisado de pele de tilápia



Fonte:Elaborado pelo autor., 2019

Tabela 12-Principais grupos observados no espectro

Numero de onda (cm ⁻¹)	Discrição	
3340	Estiramento de grupos N-H	Amida A
2360	Estiramento assimétrico de grupos CH ₂	Amida B
1792 1700	Geralmente baixa banda mais forte	Amida Cíclica
1658	Estiramento de grupos C=O	Amida I
1464	Deformação de grupos N-H acoplado com estiramento de grupos C-N	Amida II
1286	Deformação angular de grupos N-H acoplado com estiramento de grupos C-N	Amida III
1129	losn fosfato	

Fonte: Adaptação de (FIGUEIREDO., 2015b).

Com o espectro do infravermelho foi possível identificar a presença dos aminoácidos constituintes das fibras de colágeno. Doyle et al (1975) relatam que a vibração de estiramento livre de grupos N-H ocorre na faixa de 3400-3440 cm⁻¹, no entanto estes intervalos de frequência estão associados as vibrações de estiramento de grupos N-H onde existe ligações de hidrogênio, provavelmente com um grupo carbonila da cadeia peptídica, no experimento foi encontrado bandas de 3340cm⁻¹ correspondendo a esse intervalo e classificado como Amida A.

A posição da banda 2360 cm⁻¹, corresponde ao amido B relacionado ao estiramento assimétrico de grupos CH₂ (ABE NA KRIMM., 1972). As bandas 1792 e 1700 correspondem a região de amida cíclica, apresentando Lactâmicos de 5 membros, que são as antibioticos β-lactâmicos (PAIVA et al., 2010)

A Amida I, geralmente apresenta frequências de vibrações característicos no intervalo de 1600-1700 cm⁻¹, no experimento foi observado em 1658 cm⁻¹ e está associada aos compostos carbonílicos ao longo da estrutura polipeptídica e representa um marcador sensível da estrutura secundária da proteína, indicam a

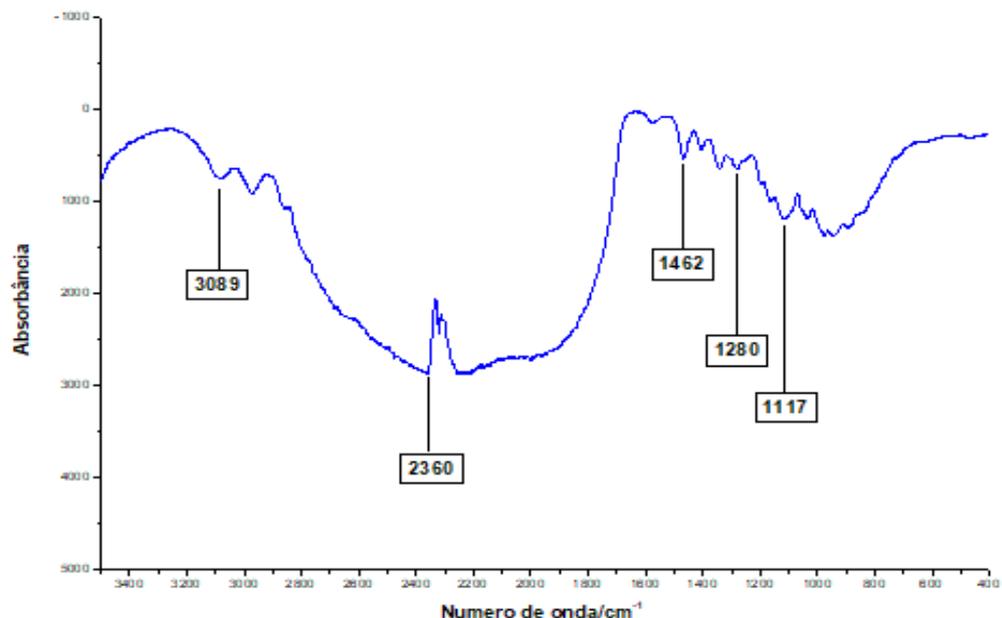
estabilidade da estrutura secundária (tripla α -hélice) da molécula de colágeno (CHI et al., 2013). Segundo Singh e colaboradores (2011) a formação de ligação de hidrogênio entre estiramento de grupos N-H (posição X) e grupos C=O (Glicina) do quarto resíduo é responsável pela iniciação da tripla hélice.

A frequência de 1464 cm^{-1} esta contida no intervalo de $1515\text{-}1570\text{ cm}^{-1}$, que representa as bandas características do Amido II que está associado à deformação de grupos N-H acoplado com estiramento de grupos C-N, a qual está associada à estrutura de tripla hélice do colágeno (JEEVITHAN., 2014). A banda de absorção em 1286 cm^{-1} está associada ao grupos N-H acoplado com estiramento de grupos C-N, característicos da Amida III (LI et al., 2013).

Além das bandas características dos aminoácidos do colágeno, foi possível observar bandas características de grupamentos fosfato de hidroxiapatita na região 1129 cm^{-1} (BOVA., 2016)

O gráfico referente a amostra de colágeno comercial (Erva doce) foi possível identificar 5 picos como sendo de colágeno hidrolisado como demonstra o gráfico (14).

Figura 14-Espectro de FTIR de colágeno comercial



Fonte: Elaborado pelo autor., 2019

Tabela 13-Principais grupamentos observados no espectro de infravermelho para colageno hidrolisado comercial.

Numero de onda (cm⁻¹)	Discrição	
3089	Estiramento de grupos N-H	Amida A
2360	Estiramento assimétrico de grupos CH ₂	Amida B
1462	Deformação de grupos N-H acoplado com estiramento de grupos C-N	Amida II
1280	Deformação angular de grupos N-H acoplado com estiramento de grupos C-N	Amida III
1117	losn fosfato	

Fonte: Adaptação de (FIGUEIREDO, 2015c).

O colageno experimental mostrou ter muito mais qualidade a nível de proteínas do que o comercial da erva doce. Dessa forma com base nos resultados disponíveis na literatura (DOYLE et al., 1975); (FIGUEIREDO., 2015d); (JEEVITHAN, 2014) foi possível analisar e identificar no espectro a presença de picos de amidas I, II e III e grupos funcionais característicos desta proteína hidrolisado.

6. CONCLUSÃO

O presente trabalho mostrou ser de grande valia em termos de rendimentos proteico e os processos empregados mostram-se muito satisfatório na obtenção do colágeno hidrolisado a partir da biomassa residual pesqueira, especificamente, pele da tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*).

A purificação de baixo custo mostrou-se muito promissor no processo de extração sendo necessário meios para confirmar tal proeza, mais no geral compriu com o esperado pelo experimento, podendo ser aplicado em processos industrial onde se tem grandes custos na purificação da proteína do colágeno.

Embora o rendimento obtido neste estudo, considera-se que o método empregado mostrou viabilidade econômica e tecnológica para a extração do colágeno a partir da pele de tilápia do Nilo é necessário que sejam realizadas mais investigações acerca da otimização do processo e melhor entendimento do mecanismo de reação.

O uso de impelidores e agitação mostrou-se muito eficiente no processo da hidrólise e no rendimento da produção de colágeno.

A utilização do rotoevaporador é de extrema importância no processo quando aplicado a escalas industriais pois se tem a reutilização dos reagentes e a não necessidade de implementação de técnicas que demanda um longo período de tempo e custo altos.

Então se tem a necessidade de mais análises para a viabilidade do processo a nível industrial e a reutilização da biomassa pesqueira em alto escalas contribuindo assim na valorização do colágeno pesqueiro e na minimização de impactos ambientais e socioeconômicos.

7. PERSPECTIVAS

Para dar continuidade a esta pesquisa, de modo a se obter resultados mais elaborados se tem a necessidade de mais análises específicos e detalhados da proteína hidrolisado, quantificar os aminoácidos presentes na cadeia de colágeno hidrolisado tipo I.

Implementação do colágeno hidrolisado de peixe em processos clínica, como transplantes de células-tronco autólogas ou reparo de cartilagem, a partir de biomateriais à base de colágeno.

Emprego do colágeno hidrolisado na culinária aumentando o nível proteico e em diversos processo na área de cosméticos, tal como criação de cremes e óleos e produtos tendo o colágeno de peixe como base.

Diminuir a quantidade de material orgânico gerados, atribuindo aos diferentes processos biotecnológicos com o intuito de gerar produtos com benefícios para a sociedade e o meio ambiente proporcionando o desenvolvimento de economia verde e da sustentabilidade.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABE, Y., KRIMM, S. Normal vibrations of crystalline polyglycin. *Biopolym: Orig. Res. Biomol.* v. 11, p. 1817- 1839, 1972

ABM ,(Laboratorios Advanced Biomatrix), *Analysis of Type I Collagen Products*, P.O. Box 502403, São Diego, CA - 92150, 2018

ALEXANDRE, A. C. S.; FARIA, C. R.; SANTOS, L. J. Otimização da extração de colágeno a partir de tendões bovinos pela metodologia de superfície de resposta. *Caderno de Ciências Agrárias* v. 9, n. 3, p. 38–48, 2017 - ISSN 2447-6218

ALVES. A. S. S., *Extração de Colágeno como Forma de Aproveitamento de Resíduos Gerados pelo Beneficiamento da Tilápia*. 2016. Monografia (Graduação em Engenharia de Biotecnologia e Bioprocesso) – Universidade Federal de Campina Grande, Sumé.

ANGELE, P. ABKE, J. KUJAT, R. FALTERMEIER, H. SCHUMANN, D. NERLICH, M. KINNER, B. ENGLER, C. RUSZCZAK, ZBIGNIEW, R. MEHRL, R. MUELLER, R. Influence of different collagen species on physico-chemical properties of crosslinked collagen matrices, *Biomaterials*, v.25, n.14, p.2831-2841, 2004

ALBERTS, B.; JOHNSON, A.; LEWIS, J.; RAFF, M.; ROBERTS, K.; WALTER, P. . *Biologia Molecular da Célula; Artmed*, Ed.; 4a .; São Paulo, 2004.

ALFARO, A. T. *Otimização das Condições de Extração e Caracterização da Gelatina de Pele de Tilápia (oreochromisurolepis hornorum)*. 2008. Tese (Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia Agroindustrial) - Universidade Federal de Pelotas, Pelotas.

ALFARO, A. T. et al. Effect of extraction parameters on the properties of gelatin from King weakfish (*Macrodonancylodon*) bones. *Food Science and Technology International*, v. 15, p. 553-562, 2009. ISSN: 10820132

ALMEIDA, P. F. de; SANTANA, J.C.C. Avaliação da qualidade de uma gelatina obtida a partir de tarsos de frango. *XXX Encontro Nacional de Engenharia de Produção (ENEGETP)*. Maturidade e desafios da Engenharia de Produção: competitividade das empresas, condições de trabalho, meio ambiente. São Carlos, SP. 2010. Disponível

em: <http://www.abepro.org.br/biblioteca/enegep2010_TN_STP_114_750_15403>. pdf Acessado em: 22 de março de 2016

BAKER, R.W. Membrane Technology and Applications. Menlo Park: *John Wiley & Sons, Ltd.*, 2004.

BRADFORD, M. M. Determinacion De Proteinas: Bradford Method. *Analytical*, 1976

BASSO, T. R. URNAU , R. M., BRANDALIZE , C. SIMÕES M. R. Extração e Caracterização de Colágeno Obtido de Peles do Processamento de Tilápia. III *Encontro Paranaense de Engenharia e Ciência*. 5f Paraná, 2013.

BARROSO, R. M.; TENÓRIO R. A.; FILHO, M. X. P.; WEBBER D. C.; BELCHIOR L. S.; TAHIM, E. F.; CARMO, F. J.; MUEHLMANN. Documentos 23. Gerenciamento genético da tilápia nos cultivos comerciais.68f. *Embrapa Pesca e Aquicultura Palmas, TO*, 2015

Bella, J., Brodsky, B., Berman, H.M. Hydration structure of a collagen peptide. *PDB (8535783)*. Structure 3: p. 893-906, 1995

BOVA, M. L. T. REAPROVEITAMENTO DE RESÍDUO INDUSTRIAL DA PESCA: EXTRAÇÃO DE COLÁGENO DE ESCAMAS DE CORVINA (MICROPOGONIAS FURNIERI) E PRODUÇÃO DE SEU HIDROLISADO. 70 f. Dissertação(Ciência e Tecnologia Ambiental) Universidade do Vale do Itajaí. Itajaí, 2016

BUENO, C. M. M., *Extração e Caracterização de Gelatina de Pele de Tilápia e Aplicação como Agente Encapsulante de Óleo de Salmão em Micropartículas Obtidas Por Coacervação Complexa*.2008. Dissertação (Faculdade de Engenharia de Alimentos) -Universidade estadual de Campinas, São Paulo.

BUENO M. C; ALVIM D. I; KOBERSTEIN.T. C. R.; Maria Célia PORTELLA, PORTELLA C. M; GROSSO C. Produção de gelatina de pele de tilápia e sua utilização para obtenção de micropartículas contendo óleo de salmão. *Brazilian Journal of Food Technology Campinas*, v. 14, n. 1, p. 65-73, jan./mar. 2011 ISSN 1981 – 6723.

CAPUTO, I; LEPRETTI, M; SCARABINO, C; ESPOSITO, C. An acetic acid-based extraction method to obtain high quality collagen from archeological bone remains. *Analytical Biochemistry*, v. 421, p. 92-96, 2012.

CARVALHO, A. M.MARQUES, A. P. SILVA, T. H. REIS, RUI. L. Evaluation of the Potential of Collagen from Codfish Skin as a Biomaterial for Biomedical Applications. *Marine Drugs*. v16, p.495 2018

CHIA, S. R. Basic techniques and Experiments in Infrared an FTIR Spectroscopy.1984.

CHI, C. F.; Wang, B.; Li, Z. R.; Luo, H. Y.; Ding, G. F. Characterization of Acidsoluble Collagens from the Cartilages of Scalloped Hammerhead (*Sphyrna lewini*), Red Stingray (*Dasyatis akajei*), and Skate (*Raja porosa*). *Food Sci. Biotechnol.* V.22, p.909–916, 2013

DEMAN, J.M. Principles of Food Chemistry. 3ed. Maryland: Aspen. p.33-107, 1999

DARMODARAN, S.; PARKIN, K. L.; FENNEMA, O. R. Química de Alimentos de Fennema. 4. ed. Porto Alegre: Artmed, 2010. ISSN 1413-8123

DECKER, A.T; RODRIGUES, E.A; ALMEIDA, J.C ; QUADRO, M.S ; LEANDRO, D; ANDREAZZA, R; BARCELOS, A.A. Avaliação dos possíveis impactos ambientais dos resíduos de pescado na localidade de Pelotas/RS,2016. *Revista Brasileira de Engenharia e Sustentabilidade* v.2, n.1, p.1-10, jul. 2016. ISSN: 2448-1661

DOYLE, B. B., BENDIT, E. G., BLOUT, E. R. infrared spectroscopy of collagen and collagen-like polypeptides. *Biopolym.* v.14, p.937-957. 1975

EMBRAPA – EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA. Pesca e aquicultura. Palmas: Embrapa, 2017. Disponível em: <https://www.embrapa.br/tema-pesca-e-aquicultura/>. Acesso em: abr. 2018.

FAO – FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION. Global aquaculture production statistics 2009. 256 p. Rome: 2011. ISSN: 2070-7010.

FAO .The State of World Fisheries and Aquaculture 2018 - Meeting the sustainable development goals. 227p. Rome: 2018.ISSN: 1020-5499

FERREIRA, M. F. *Extração e caracterização de gelatina proveniente de subprodutos do frango: pés*, 2013. 48 f. Trabalho de conclusão (Engenharia de Alimentos) Universidade Tecnológica Federal do Paraná – UTFPR, Campo Mourão

FERNANDES, A. *Uso de espectroscopia de infravermelho com transformada de fourier (ivtf) e quimiometria para classificação de vinho e suco de uva*. 39f. 2015. Monografia (Química) Universidade Tecnológica Federal do Paraná- Campos Pato Branco, 2015.

FELTES, M. M. C.; CORREIA, J. F. G.; BEIRÃO, L. H.; BLOCK, J. M.; NINOW, J. L.; SPILLER, V. R. Alternativas para a agregação de valor aos resíduos da industrialização de peixe, 2010. *Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental*, v.14, n.6, p. 669-677, 2010.ISSN 1807-1929.

Fessler, J.H. (1974). Self-assembly of collagen. *Journal of Supramolecular Structure*, 2, 99–102

FITZSIMMONS, K. TILAPIA: The most important aquaculture species of the 21st Century. In: *Interational Symposium on Tilapia Aquaculture*, 2000. Ministry of Agriculture, Rio de Janeiro 2000. p. 3-8. ISSN 0115-4435

FIGUEIREDO, G. I. *Elaboração de compósitos de nanohidroxiapatita e colágeno proveniente de resíduos do beneficiamento de tilápia do Nilo (Oreochromis niloticus)*. 71f. 2015. Dissertação (Programa de PósGraduação em Química da Universidade Federal) Universidade Federal de Ceará –Fortaleza, 2015

FRANZEN, J. M; SANTOS, J. M. S. R; ZANCANARO, V; colágeno: uma abordagem para a estética. *Revista Interdisciplinar de Estudos em Saúde (RIES)*. v.2, n.2, p. 49-61, 2013 ISSN 2238-832X

Franco, M.L.R.S; Franco, N.P; Gasparino, E; Dorado, D.M; Prado, M; Vesco, A.P.D. Comparação das peles de tilápia do Nilo, pacu e tambaqui: Histologia, composição e resistência. *Archivos de Zootecnia*. Córdoba v.62 n.237,2013. ISSN 1885-4494

FRIESS, W. Collagen – Biomaterial for Drug Delivery. *European Journal of Pharmaceutics*, v. 45, p. 113-136, 1998.ISSN: 0928-0987

GREEN, Ar. Alden.; HUGHES, W. L. Protein fractionation on the basis of solubility in aqueous solutions of salts and organic solvents. *Methods in Enzymology*. v.1, Pag 67-90, 1955.

GÓMEZ-GUILLÉN, M. C.; GIMÉNEZ, B.; LÓPEZ-CABALLERO, M. E.; MONTERO, M. P. Functional and bioactive properties of collagen and gelatin from alternative sources: A review. *FoodHydrocolloids*, v. 25, p. 1813-1827, 2011.ISSN 0268-005X.

Goméz-Guillén MC, Fernández-Díaz MD, Ulmo N, Lizarbe MA, Montero P. Structural and physical properties of gelatin extracted from different marine species: a comparative study. *Food Hydrocolloids*. v.16, p25-34, 2002

GONÇALVES, G. R. OLIVEIRA, M. A. S. MOREIRA, R. F BRITO, D Benefícios da Ingestão de Colágeno para o Organismo Humano. *Revista Eletrônica de Biologia* v.8, n.2, p.190-207, 2015.ISSN 1983-7682.

HARNEDY, P. A., FITZGERALD, R. J. Extraction of protein from the macroalga *Palmaria palmata*. *LWT - Food Science Technoogy*, v. 51, p. 375-382, 2013.

HASHIM, P. MOHD RIDZWAM, M. S. BAKAR, J. MAT HASHIM, D. Collagen in food and beverage industries. *International Food Researchjournal*,v.22, n.1, p.1-8.2015. ISSN 2231-754.

HUANG, C.Y., KUO, J.M., WU, S.J. & TSAI, H.T. Isolation and characterization of fish scale collagen from tilapia (*Oreochromis* sp.) by a novel extrusion–hydro-extraction process. *Food Chemistry*, v.190, p.997-1006, 2016. ISSN 0308-8146.

IANNOTTI, J. P.; PARKER, R. D.; NETTER, F. H.; Sistema Musculoesquelético: Biologia e Doenças Sistêmicas, 2. Ed Arte & Ideia Identidade Visual. Rio de Janeiro .v.6. Parte 3, 2014

JOHNS, P; COURTS, A. *Relationship between collagen and gelatin.*, The science and technology of gelatin. London: In A. G. W; A. COURTS (Eds.),1977 academic press 138-177.

JÚNIOR C. A. F.; JÚNIOR A. S. V. Cultivo de tilápia no Brasil: origens e cenário atual, 2008. *Sociedade Brasileira de Economia, Administração e Sociologia Rural*. Rio Branco–Acre. Disponível em: <<http://www.sober.org.br/palestra/9/178.pdf>>. Acessado em 27 jun. 2018.

JEEVITHAN, E.; Bao, B.; Bu, Y.; Zhou, Y.; Zhao, Q.; Wu, W. Type II Collagen and Gelatin from Silvertip Shark (*Carcharhinus Albimarginatus*) Cartilage: Isolation, Purification, Physicochemical and Antioxidant Properties. *Mar. Drugs*. V.12, p.3852–3873, 2014

JUNIOR, C. F. J.; CEKINSKI, E.; NUNHEZ, J. R.; URENHA, L. C. Agitação e mistura na indústria. – Rio de Janeiro: LTC, 2012. Págs. 6-10

KITTIPHATTANABAWON, P.; BENJAKUL, S.; VISESSANGUAN, W.; KISHIMURA, H.; SHAHIDI, F. Isolation and Characterisation of Collagen from the Skin of Brownbanded Bamboo Shark (*Chiloscyllium punctatum*). *Food Chem.* 2010, 119, 1519–1526.

LEE, C. H.; SINGLA, A.; LEE, Y. Biomedical applications of collagen. *International Journal of Pharmaceutics*, v. 22, p. 1-22, 2001. ISSN: 0378-5173

LEITE, J. G. Aplicação das Técnicas de Espectroscopia FTIR e de Micro Espectroscopia Confocal Raman à Preservação do Património. 76f. 2008. ISSN 0073-9855.

MOHAMAD, M. MOHAMAD, M.W. ALI, A. RIPIN, A. Ahmad Effect of extraction process parameters on the yield of bioactive compounds from the roots of *Eurycoma longifolia* J. Teknol., v.60 , pag. 51-5, 2013

Moula Ali, A. M; Kishimurab, H; Benjakula, S. Extraction efficiency and characteristics of acid and pepsin soluble collagens from the skin of golden carp (*Probarbus Jullieni*) as affected by ultrasonication. *Process Biochemistry*. V.66, P. 237-244, 2018

MARTONE C, BORLA O, S'ANCHEZ J. Fisheryby-product as a nutrient source for bacteria and archaea growth media. *Bioresource Technology* v.96, n.3, p.383-387, 2005. ISSN: 0960-8524.

MINISTÉRIO DA PESCA E AQUICULTURA (MPA). Boletim Estatístico da pesca e Aquicultura: 398 Brasil 2013. *Ministério da Pesca e Aquicultura*, p. 128, 2013. ISSN 0046-9939

MONTE, F. T. D; *Caracterização do colágeno extraído a partir de escamas de pescada amrela (Cynoscionacoupa)*, 2016. 56 f. Dissertação (Bioquímica e Fisiologia) - Universidade Federal de Pernambuco, Recife

MONTERO, P., GÓMEZ-GUILLÉN, M. C. Extracting conditions for megrim (*Lepidorhombus bosci*) skin collagen affect functional properties of the resulting gelatin, 2000. *Journal of Food Science*, 65, n. 3, 434-438. ISSN: 0975-8402.

MOLINARI, M. C. *Extração e Caracterização de Gelatina a Partir de Subprodutos de Tilápia*, 2014. 50 f. Trabalhos de Conclusão (Graduação em Engenharia de Alimentos) - Universidade Tecnológica Federal do Paraná – UTFPR, Campo Mourão

NAGATANI, T.; SAITO S.; SATO, M.; YAMADA, M. Development of an ultra high resolution scanning electron microscope by means of a field emission source and in-lens system. *Scanning Microscopy*. v.11, p.901-909, 1987. ISSN:0892-953X

Noitup, P., Morrissey, M.T. & Garnjanagoonchorn, W. In vitro self-assembly of silver-line grunt type I collagen: effects of collagen concentrations, pH and temperatures on collagen self-assembly. *Journal of Food Biochemistry*, v30, p547–555, 2006.

NUNES, R.; VIANA, A.; SON, C.; BRUM, L.; OLIVEIRA, L.; COSTA, H. *Aproveitamento de Resíduos de Pescado na Região dos Lagos: Uma Questão Ambiental*. Revista Saúde, Corpo, Ambiente & Cuidado, v. 1, n. 1, p. 58-70, 2013.

OLIVEIRA, M. M. *Dietas para Reprodutores de Tilapia do Nilo (Oreochromis niloticus)*, 2012. 96 f. Tese (Pós-graduação em Ciências Veterinárias) - Universidade Federal Lavras, Lavras.

OLIVEIRA, A. S. C; *Utilização de microrganismos eficazes como probióticos no cultivo de tilápias do Nilo*, 2011. 73 f. Dissertações (Pós- Graduação em Ciência Animal) – Universidade Federal do Pará

OLIVEIRA, V. M., Assis, C.R.D., Herculano, P.N., Cavalcanti, M.T.H., Bezerra, R.S. & Porto, A.L.F. Collagenase from smooth weakfish: extraction, partial purification,

characterization and collagen. *Boletim do Instituto de Pesca*, v.43, n.1, p.52-64, 2017. ISSN 1678-2305

OLIVEIRA, E , SANTOS F, PEREIRA A, LIMA C. *Produção de Tilápia: mercado, espécies, biologia e recría*. Teresina: MAPA/Embrapa Meio Norte Circula Técnica, 45. 12 f. ISSN 0104-7633, 2007

PRESTES R. C Colágeno e Seus Derivados: *Características e Aplicações em Produtos Cárneos*. 10 f. UNOPAR Científica. Ciências Biológicas e da Saúde, v.15, n.1, p 65-74, 2013.

PEIXE BR. Associação Brasileira de Piscicultura. Anuario, 71 f. 2018. Disponível em: <<https://www.peixebr.com.br/anuario2018/>>. Acesso em: 01/02/2019.

RUSTAD T. Utilization of marine by-products. *Electronic Journal of Environmental, Agricultural and Food Chemistry*, v.2, n.4, 2003. ISSN: 1579-4377

SANTOS, M. F. Isolamento e caracterização de colágeno a partir da biomassa residual de peixes (cartilagens de elasmobranchii). 112 f. Dissertações (Tecnologias Química e Biológica) - Universidade de Brasília Instituto de Química. Brasília, 2017.

SUJITHRA, S., KIRUTHIGA, N., PRABHU, J., KUMERESAN, R. Isolamento e determinação do colágeno tipo I de tilápia (*Oreochromis niloticus*) de resíduos. *Revista Internacional de Engenharia e Tecnologia (IJET)*. ISSN: 0975-4024, v. 5 n. 2013.

SCHULTER E. P; FILHO J. E. R. V. Evolução da piscicultura no brasil: diagnóstico e desenvolvimento da cadeia produtiva de tilápia. *Texto para Discussão*. Rio de Janeiro v.2328, n.42, p.9-22, 2017. ISSN 1415-4765.

SOUZA M, DOURADO D, MACHADO S, BUCCINI D, JARDIM M, MATIAS R et al. Análises da pele de três espécies de peixes: histologia, morfometria e testes de resistência. *Revista Brasileira de Zootecnia*, v.32, n.6, p. 1551-1559, 2003. ISSN 1516-3598.

SHIMOKOMAKI, M. Aproveitamento de sub-produtos das indústrias cárneas para produção de colágenos e suas aplicações. *Revista Nacional da Carne*, São Paulo, v.16, n.187. p.32-34, 1992. ISSN 1413-4837.

SILVA T. F.; PENNA A. L. B. Colágeno: Características Químicas e Propriedades Funcionais. *Revista do Instituto Adolfo Lutz*, São Paulo, v.71, n.3, p.530-539, 2012. ISSN 1983-3814.

SINGH, P.; BENJAKUL, S.; MAQSOOD, S.; KISHIMURA, H. Isolation and characterisation of collagen extracted from the skin of striped catfish (*Pangasianodon hypophthalmus*). *Food Chemistry*, v. 124, p. 97–105, 2011.

SILVA, M. C.; *Extração, caracterização e hidrólise enzimática do colagénio da pele do peixe-espada-preto*, 2016. 79f. Dissertação (Engenharia de Alimentos). Universidade de Lisboa.

SILVA, J. M. et al. In vivo and in vitro inhibition of cholinesterase activity in *Colossoma macropomum* (tambaqui) fingerlings by the herbicide trifluralin. *Ecotoxicology and Environmental Contamination*, v. 10, n. 1, p. 23–30, 2015.

SILVA, R. S. G. BANDEIRA, S. F. PETRY, F. C. PINTO, L. A. A. *Extração de gelatina a partir das peles de cabeças de carpa comum*. *Ciência Rural*, v.4, n.5, 2011 ISSN 1678-4596.

SGARBIERI, V. C. *Proteínas em Alimentos Protéicos: Propriedades, Degradações, Modificações*. Ed. Varela, São Paulo, p. 517, 1999.

SADOWSKA, M.; KOŁODZIEJSKA, I.; NIECIKOWSKA, C. Isolation of collagen from skins of Baltic cod (*Gadus morhua*). *Food Chemistry*, v.81, p. 257–262, 2003. ISSN 0308-8146.

SEIFTER, S. GALLOP, P.. *Preparation and Properties of Soluble Collagens*. 4.ed. New York: Academic Press, 1963.

SOUZA, M.L.R. *Tecnologia para processamento das peles de peixe*. 1.ed. Maringá: 59p. (Coleção Fundamentum, 11). 2004. ISBN: 85-7628-021-3

SOUZA, M. L. R; SANTOS, H. S. L; Análise morfológica da pele da tilápia do nilo (*Oreochromis niloticus*) através da microscopia de luz, 1997. *Revista UNIMAR* v.19 n.3. ISSN:8881-888

SCHRIEBER R, GAREIS H. Gelatine handbook: theory and industry practice. Hardcover; 1st Ed, p.45-117, 2007

TOSH, S.M.; MARANGONI, A.G.; HALLET, F.R.; BRIT, I.J. Aging dynamics in gelatin gel microstructure. *Food Hydrocolloids*, v.17, p.503-513. 2003

TONHI, E.; PLEPIS, A.M.G. Obtenção e caracterização de blendas colágeno-quitosana. *Química Nova*, São Paulo v.25, n.6, p.943-948, 2002. ISSN 0100-4042.

TORLEY, P. J; DARCY B. R; TROUT G. R; The effect of ionic strength, polyphosphates type, pH, cooking temperature and preblending on the functional properties of normal and pale, soft, exudative (PSE) pork. *Meat Sci.* v.55, p451-62, 2000

YUE, GEN HUA & LIN, HAORAN & LI, JIALE. Tilapia is the Fish for Next-Generation Aquaculture. *International Journal of Marine Science and Ocean Technology.* v3. p.11-13, 2016.

WANG, L.; YANG B.; DU, X.; YANG, Y.; LIUD, J. optimization of conditions for extraction on acid-soluble collagen from grass carpe (*ctenopharyngodon idella*) reponse surface methodology. *innovative food science e emerging technologies*, v. 9, n. 4, p. 604-607, 2008

Wang H, Liang Y, Wang H, Zhang H, Wang M, Liu L. Physical-chemical properties of collagens from skin, scale, and bone of grass carp (*Ctenopharyngodon idellus*). *Journal of Aquatic Food Product Technology.* 2013;23(3):264-277. DOI: 10.1080/10498850.2012.713450

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

ZHANG, J.; DUAN, R.; TIAN, Y.; KONNO, K.; Characterisation of acid-soluble collagen from skin of silver carp (*Hypophthalmichthys molitrix*). *Food Chemistry.* V. 126, n.1, p.318-322, 2009. ISSN 0308-8146.

ZOU , M. /Yang, H.Wang, H.Wang,H.Zhang,J.Wei, B.Zhang, H.Xie, D. Detection of type I collagen fibrils formation and dissociation by a fluorescence method based on thioflavin T.*Int. J. Biol. Macromol.* v.92, p.1175–1182, 2016

ZAHRANI, R. A. Extraction and Isolation of Collagen Type I from Fish Skin. 52f *Postgraduate Science*. University of Otago. New Zealand, 2011