



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO CIÊNCIAS
PESQUEIRAS NOS TRÓPICOS - PPG-CIPET**



PPGCIPET
Programa de Pós-Graduação em Ciências
Pesqueiras nos Trópicos

KLARAMELIA CONSUELO RAMÓN CARPIO

EXTRAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE COLÁGENO DA PELE DE PIRARUCU

MANAUS

2018

KLARAMELIA CONSUELO RAMÓN CARPIO

EXTRAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE COLÁGENO DA PELE DE PIRARUCU

Dissertação apresentada para o cumprimento parcial das exigências para obtenção do título de Mestre em Ciências Pesqueiras dos Trópicos pela Universidade Federal do Amazonas.

Orientador: Prof. Dr. Antônio José Imhamuns da Silva

Co-orientador: Prof. Dr. Ranilson de Souza Bezerra

MANAUS

2018

KLARAMELIA CONSUELO RAMÓN CARPIO

EXTRAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE COLÁGENO DA PELE DE PIRARUCU

Dissertação apresentada para o cumprimento parcial das exigências para obtenção do título de Mestre em Ciências Pesqueiras dos Trópicos pela Universidade Federal do Amazonas.

Orientador: Prof. Dr. Antônio José Imhamuns da Silva

Co-orientador: Prof. Dr. Ranilson de Souza Bezerra

Aprovado por:

Prof. Dr. Antonio José Inhamuns da Silva

Prof. Dr. Rogério Souza de Jesus

Profa. Dra. Francisca das Chagas do Amaaral Souza

Data: 18/05/2018

A Deus, o Senhor e Criador dos confins da Terra, que tem inescrutável o seu entendimento, Aquele em quem espero e renovo minhas forças cada momento.

A minha mãe e minha filha pelo amor e coragem de sempre.

AGRADECIMENTOS

Meu eterno agradecimento a Deus por ser Ele que me guiou e deu força para cumprir um dos meus objetivos providenciando tudo o que precisei para concluir o mestrado em terras estrangeiras.

Ao professor Dr. Antônio José Inhamuns da Silva pela confiança depositada em mim, mesmo antes de ser sua aluna no mestrado teve a paciência de me orientar e ajudar amadurecer como pessoa e profissional na realização deste trabalho.

Ao professor Dr. Ranilson de Souza Bezerra da Universidade Federal de Pernambuco pelo apoio e consideração para realizar os análises mais importantes da dissertação, dispondo por completo o laboratório de enzimologia (LABENZ) e gestionando tudo para completar minhas análises.

Aos meus pais em especial e minhas irmãs mais velhas, pois ser sempre o apoio que poucas pessoas têm como privilégio hoje em dia. Estarei sempre grata por tudo que fizeram e ainda fazem e sei que farão por mim.

A minha filhinha (mi hijita) Zively Antonella por ser compreensiva, carinhosa e corajosa para seguir a sua mãezinha (mamita) durante toda esta etapa.

Aos integrantes do LABENZ na UFPE, Robson, Flávia, Thiago e Janilson, e também todos aqueles que me auxiliaram no que puderam como Rodolfo, Júlio, Gina, o Prof Dr Motta da UFAM e muitos mais, para realizar este trabalho e me orientando com humildade.

A todos os integrantes da família do Laboratório de Tecnologia do Pescado em especial Ivana, Paulinha e Cristiane, pelo companherismo, amizade e carinho outorgado desde o momento que cheguei ao laboratório.

Ao Programa em Ciências Pesqueiras nos Trópicos por ter me ajudado e orientado na realização do meu trabalho, em especial à Profª Kedma.

Ao Conselho Nacional de Pesquisas (CNPq), pelo auxílio financeiro providenciado para o desenvolvimento deste trabalho.

Aos amigos e irmãos da Igreja Adventista do Sétimo Dia Parque das Garças que com suas orações, carinho e amizade sempre fizeram que me sinta em família aqui no Brasil, em especial a Karla e família em Recife e Llalina e família em Manaus.

Grata a todos.

“O temor do Senhor é o princípio do conhecimento...”

(Livro dos Provérbios capítulo 1 verso 7)

RESUMO

O aproveitamento integral dos recursos pesqueiros tem produzido muitas pesquisas sobre os aspectos tecnológicos e nutricionais com fins comerciais de várias espécies incentivando o crescimento industrial. Responsáveis pelo aumento do ônus ambiental mas ricos em colágeno e outras biomoléculas, os resíduos do processamento do pescado tornam-se subprodutos de maior valor comercial. Por tais motivos a presente pesquisa contemplou o aproveitamento de aqueles resíduos e ou subprodutos para extrair colágeno, nesse caso, da pele do pirarucu (*Arapaima gigas*) que é uma espécie emblemática da Bacia Amazônica, e em vez de descartar eles, esses resíduos tornou-se atrativo para o seu estudo e viabilização na extração de biomoléculas, especialmente o colágeno, tendo em vista a sua ampla aplicabilidade científica e biotecnológica. O processo de extração contou de duas etapas principais, a primeira de pré tratamento da pele com uma solução NaOH 0,05M, álcool butílico 10% e a segunda que é de extração do colágeno com uma solução de ácido acético 0,5M. Todo o processo foi realizada a 20°C. Após ter realizado o processo de extração foram realizados os análises de caracterização do colágeno. O rendimento obtido foi de 27,8% e por meio do SDS PAGE (Eletroforese em gel de poliacrilamina - Dodecil sulfato de sódio) foi determinado que o colágeno obtido é do tipo I. Esse colágeno mostrou maior solubilidade relativa em pH 3 e diminuição da solubilidade a partir do 3% de concentração de NaCl. A temperatura de desnaturação do colágeno foi de 38,1°C e sua estrutura molecular permaneceu intata durante todo o processo de extração o qual foi visualizada mediante a técnica do FTIR (espectrofotometria de infravermelho com transformada de Fourier), apresentando um rádio de absorção de aproximadamente 1. Os resultados obtidos mostraram que é possível obter colágeno a 20°C a partir da pele de pirarucu, o colágeno obtido apresenta as características típicas do colágeno tipo I comercial e o procedimento utilizado sugere ser uma alternativa interessante para a extração do colágeno da pele do pirarucu pois com esse procedimento de extração utilizado o colágeno obtido manteve a sua estrutura molecular da tripla hélice estável; dando a conhecer à sociedade que o aproveitamento integral e sustentável dos recursos pesqueiros, nesse caso do pirarucu, é uma alternativa para o crescimento industrial e diminuição de poluição ambiental gerando novos produtos a partir de resíduos obtidos do processamento do pescado.

Palavras – chave: Pirarucu, colágeno de peixe, subprodutos, resíduos .

LISTA DE FIGURAS

Figura 1:	Produção mundial da pesca de captura e aquicultura.....	13
Figura 2:	Pirarucu (<i>Arapaima gigas</i>) - figura esquemática.....	15
Figura 3:	Resumo da informação disponível sobre a distribuição geográfica do gênero <i>Arapaima</i> no norte da América do Sul	15
Figura 4:	Estrutura do colágeno.....	17

LISTA DE QUADROS

Quadro 1:	Principais tipos de colágeno no organismo e desordens associadas.....	19
Quadro 2:	Composições médias de aminoácidos em peles de mamíferos e peixes ósseos.....	20
Quadro 3:	Colágeno extraído de várias espécies de peixes.....	22
Quadro 4:	Conteúdo de aminoácidos do colágeno tipo I na pele humana e do pescado.....	23

LISTA DE ABREVIATURAS

FAO	Organização das Nações Unidas para a Agricultura e a Alimentação
OMS	Organização Mundial de Saúde
EEB	Encefalopatia espongiforme bovina
EET	Encefalopatia espongiforme transmissível
FA	Febre aftosa
PSC	Colágeno pepsino solúvel
ASC	Colágeno ácido solúvel
NaCl	Cloreto de sódio
NaOH	Hidróxido de sódio
HCl	Ácido clorídrico
EDTA-2Na	Ácido etilenodiamino tetra-acético dissódico
nm	nanômetro
kDa	Quilodalton
pH	potencial Hidrogeniônico
pI	ponto Isoelétrico
Td	Temperatura de desnaturação
SDS	Dodecil sulfato de sódio

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	12
2. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA	13
2.1. Pesca e aquicultura	13
2.2. O pirarucu (<i>Arapaima gigas</i>).....	14
2.3. Resíduos de pescado como fonte de biomoléculas	16
2.4. Colágeno	17
2.5. Fontes de obtenção do colágeno.....	20
2.6 Usos e aplicações do colágeno.....	21
2.7 Caracterização do colágeno	24
2.7.1 Eletroforese em gel de poliacrilamida (PAGE-SDS)	24
2.7.2 Espectrofotometria de infravermelho com transformada de Fourier (FT-IR)	24
2.7.3 Temperatura de desnaturação	25
2.7.4 Solubilidade do colágeno	25
3. OBJETIVOS	27
3.1. Geral	27
3.2. Específicos	27
REFERÊNCIAS BIBLIOGRAFICAS	28
APÊNDICE A – ARTIGO CIENTÍFICO	38

1. INTRODUÇÃO

Colágeno é uma família de proteínas fibrosas encontradas em todos os animais multicelulares, sendo o elemento estrutural principal de peles, ossos, tendões, cartilagens, vasos sanguíneos, dentes e córnea, constituindo uma quantidade próxima entre 25% (OGAWA et al., 2004) e 30% do conteúdo total de proteína (JONGJAREONRAK et al., 2005). Providencia suporte mecânico, resistência, elasticidade a vários órgãos e tecidos sendo disponíveis, biodegradáveis e biocompatíveis, estimulando o crescimento celular (SKOPINSKA-WISNIEWSKA et al., 2016). Devido ao risco de transmissão de doenças como Encefalopatia Espongiforme Bovina (EEB), Encefalopatia Espongiforme Transmissível (EET), Febre Aftosa (FA) (KITTIPIHATTANABAWON et al., 2005) e a obtenção a partir de peles e ossos de porco, que não pode ser usado devido à restrição religiosa, estilo de vida e disponibilidade (BATISTA et al., 1998) torna-se necessário buscar fontes dessa proteína a partir dos organismos aquáticos (SADOWSKA et al., 2003). Sendo o colágeno o principal componente do tecido conjuntivo, sua importância para ser consumida também está relacionada para evitar os distúrbios metabólicos e genéticos que se apresentam pela sua falta e anormalidade no ser humano, tais como o escorbuto, a osteogênese imperfeita e a síndrome de Ehlers-Danlos (BAYNES et al., 2015).

O pirarucu (*Arapaima gigas*) é considerado o maior peixe de escamas de água doce com renome internacional pelas mantas salgadas que no passado era consumido pelo mercado europeu, por sua singularidade como espécie ornamental nas mãos de comerciantes em todo o mundo (ONO et al., 2004) e pela sua conversão alimentar e aproveitamento de carne é anunciado como o “bacalhau” brasileiro (SIDONIO et al., 2012); mas apesar disso, o aumento de desperdício durante o seu beneficiamento, conhecidos como resíduos do processamento e comércio do pirarucu que inclui pele, cabeça, vísceras, nadadeiras, escamas e carcaça, poderiam ser considerados subprodutos com maior valor agregado (FREITAS-JÚNIOR et al., 2012). Consequentemente, o aproveitamento integral dos recursos pesqueiros produziram muitas pesquisas sobre os aspectos tecnológicos e nutricionais com fins comerciais de várias espécies assim como incentivar ao crescimento industrial na região (SOUZA e INHAMUNS, 2011) é por isso que a utilização desses resíduos do processamento, particularmente as peles e ossos, tornam-se fontes alternativas para obter colágeno (GOMEZ-GUILLEN et al., 2002; KITTIPIHATTANABAWON et al., 2005) assim como outras biomoléculas (enzimas, polissacarídeos, etc.) (SEIBEL e SOARES, 2003). Por tais motivos o aproveitamento dos resíduos do processamento e comércio do pirarucu vai outorgar à sociedade uma alternativa para diminuir o ônus ambiental, gerando novos produtos a partir de subprodutos e ajudando ao crescimento econômico das comunidades pesqueiras.

2. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

2.1. Pesca e aquicultura

A produção total da pesca por captura no mundo em 2014 foi de 93,4 milhões de toneladas (81,5 milhões de toneladas das águas marinhas e 11,9 milhões de toneladas das águas continentais), com China sendo o principal produtor. Entre os dezesseis (16) principais países produtores da pesca de captura em águas continentais, o Brasil encontra-se no segundo lugar com 235.527 toneladas, depois de Bangladesh que ocupou o primeiro lugar com 995.805 toneladas em 2014, e representando todos eles 80% do total mundial (FAO, 2016).

A produção total da aquicultura em 2014 ascendeu a 73,8 milhões de toneladas (47,1 milhões de toneladas das águas continentais e 26,7 milhões de toneladas das águas marinhas), com a China sendo responsável por mais do 60% da produção pesqueira mundial procedente da aquicultura (Figura 1). O Brasil encontra-se entre os 25 primeiros produtores na aquicultura mundial com uma produção total aquícola de 562,5 mil toneladas, sendo a China que ocupa o primeiro lugar com uma produção aquícola total de 58.795,3 mil toneladas (FAO, 2016).

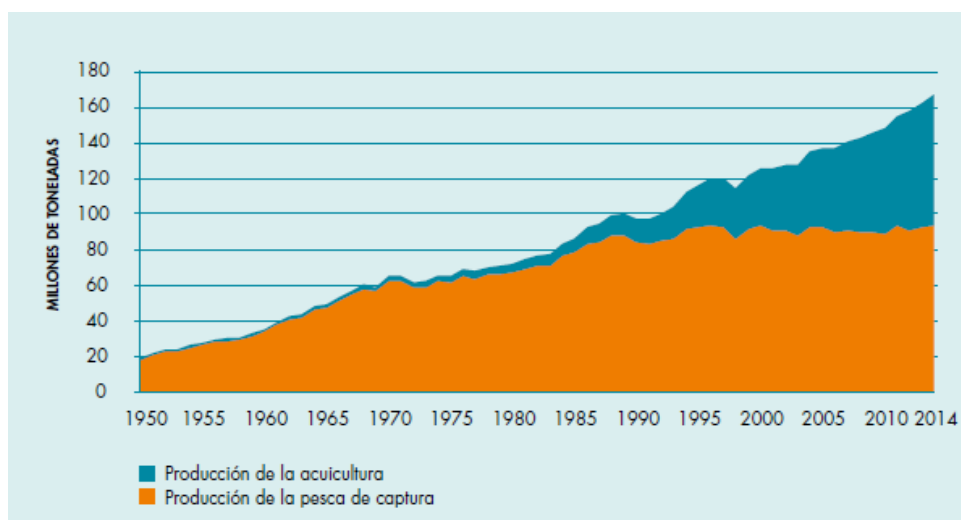


Figura 1. Produção mundial da pesca de captura e aquicultura (FAO, 2016).

A porcentagem da produção pesqueira mundial que é usada para consumo humano direto, aumentou consideravelmente até o 2014, de 67% a 87%, que equivale a mais de 146 milhões de toneladas. Os 21 milhões de toneladas restantes, destinaram-se a produtos não alimentares (especialmente farinha ou azeite de pescado) e, outros para diversos fins, como a alimentação direta na aquicultura (FAO, 2016).

Existe a previsão de que a contribuição da aquicultura na produção pesqueira mundial tem aumentado 44% em média, entre 2013-2015 e vai superar a pesca de captura em 2021 (FAO, 2016).

A visão geral da aquicultura brasileira segundo o IBGE (2016) mostra uma aquicultura em crescimento principalmente na criação de peixes (70,9%) e na criação de camarões (19,3%) (IBGE, 2016). Segundo o levantamento realizado pela Associação Brasileira da Piscicultura (PEIXE BR) em 2017 a piscicultura brasileira cresceu 8% atingindo 697 mil toneladas e se tornando o 4º maior produtor mundial de tilápia representando 51,7% da Piscicultura nacional, com 357.639 toneladas. O Paraná é o maior produtor de tilápia do Brasil, com 105.392 toneladas. Rondônia e Amazonas (região Norte), Mato Grosso e Goiás (região Centro-Oeste) e Maranhão (região Nordeste) são os maiores produtores de peixes nativos do Brasil liderando o tambaqui, pirapitinga, pacu e seus híbridos, principalmente tambatinga. Os cinco estados, juntos, representam 69% da produção total de peixes nativos, lembrando que estas espécies estão mais disseminadas pelo Brasil, especialmente pelas regiões Norte, Centro-Oeste e Nordeste. De acordo com o levantamento da PEIXE BR, somente no Distrito Federal não há cultivo de peixe nativo (REVISTA PANORAMA DA AQUICULTURA, 2018).

Segundo o IBGE, a quantidade de pirarucu produzido no Brasil no ano 2016 foi de 8.637,5 ton representando 1,7% da quantidade total de peixes produzidos tendo concentrada sua cadeia produtiva no estado de Rondônia com uma produção que representa 94% do total cultivado no país enquanto o estado do Amazonas fica com 1% (PEDROZA et al., 2016). Os principais compradores dos pirarucus produzidos nas propriedades de engorda são as indústrias frigoríficas, em especial as de Rondônia, e restaurantes locais e de outros estados (REBELATTO et al., 2015).

Segundo os dados da Organização das Nações Unidas para a Agricultura e Alimentação, o consumo brasileiro de pescado tem diminuído a um valor inferior a 10kg/hab/ano, mesmo que o Brasil tenha um alto potencial de produção (BRASIL RURAL, 2017).

2.2. O pirarucu (*Arapaima gigas*)

Conhecido com o nome de paiche (Figura 2) no Peru e Colômbia, encontra-se na Bacia Amazônica (florestas alagadas, rios, lagos, e algumas drenagens costeiras do Brasil) (Figura 3), atinge até 200 kg de peso total e, é por esses motivos que aumenta o crescente interesse dos piscicultores na sua exploração comercial (PEREIRA-FILHO e ROUBACH, 2005; OLIVEIRA et al., 2014).



Figura 2. Pirarucu (*Arapaima gigas*) – figura esquemática.

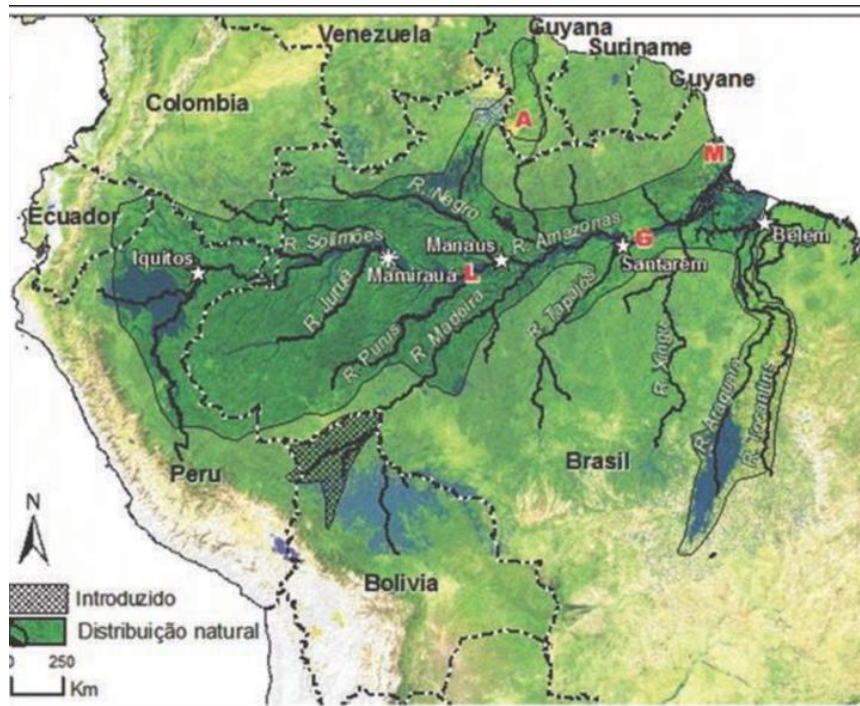


Figura 3. Resumo da informação disponível sobre a distribuição geográfica do gênero *Arapaima* no norte da América do Sul. Mapa modificado de Castello e Stewart (2010). Fronteiras políticas são mostradas com linhas pontilhadas. Estrelas indicam cidades mencionadas no texto. Áreas em azul indicam áreas alagáveis (CASTELLO, et al., 2013). Área de introdução do pirarucu na Bolívia é de Miranda-Chumacero, et al. (2012). Localidades de coleta de espécies diferentes são indicadas por letras: G = *A. gigas*, M = *A. mapae*, A = *A. arapaima*, e L = *A. leptosoma*; a localidade para *A. agassizii* é desconhecida (Stewart 2013 a, b). Fonte: Castello et al. (2014).

A sua distribuição geográfica (Fig 3) geralmente é determinada pelas barreiras geográficas habitando em ambientes com correnteza fraca ou nula (QUEIROZ-SARDINHA, 1999; CASTELLO, 2008a).

Na Amazônia, o pirarucu (*Arapaima gigas*) é identificado pelas comunidades tradicionais como oportunidade de geração de renda sendo que em 2015 movimentou R\$ 1 milhão para cerca de 400 famílias envolvidas no manejo da espécie (ICMBio, 2017). Esse manejo está sob a responsabilidade das Unidades de Conservação (UCs) criadas pela Lei N° 9.985 de 2000, e atualmente são sete (7) reservas extrativistas (Resex) administradas pelo Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade (ICMBio) realizando o manejo sustentável da espécie: Resex Médio Purus, Rio Jutai, Auati-Paraná, Médio Juruá, Rio Ituxi, Rio Unini e Baixo Juruá, todas no estado do Amazonas (ICMBio, 2017). Além disso, temos as RDS (Reserva de Desenvolvimento Sustentável) que de acordo com o Cadastro Nacional de Unidades de Conservação (CNUC), até o início de julho de 2015, existiam 36 RDS no país: 2 nacionais, 29 estaduais e 5 municipais. São exemplos: a Reserva de Desenvolvimento Sustentável Mamirauá (AM), a Reserva de Desenvolvimento Sustentável Veredas do Acari (MG), a Reserva de Desenvolvimento Sustentável Estadual Ponta do Tubarão (RN) e a Reserva de Desenvolvimento Sustentável do Rio Negro (AM) (OEKO, 2015). Cavero e Fonseca (2016) afirmam que tanto o pirarucu de piscicultura quanto de áreas manejadas participam do mesmo mercado, a variação está no preço. Quando comercializados sem cabeça e sem vísceras o preço é de R\$ 3,50/kg; filé com pele e costela entre R\$ 8,00/kg a R\$14,00/kg e o filé *in natura* entre R\$ 9,00/kg a 15,50/kg.

Entre os principais produtos obtidos do pirarucu constam filés frescos e congelados, produtos salgado-secos e os defumados (ao frio ou quente) para o comércio nacional e internacional. Outros subprodutos a serem aproveitados são a pele, que representa entre 7 a 9% do peso do animal sendo transformada em couro para uso de vestuário com alto valor agregado (bolsas, calçados, roupas, carteiras, cintos, entre outros artefatos); as escamas que representam entre 6,6 a 9,7% têm valor comercial na confecção de artesanatos regionais (colares, ornamentos para casa, entre outros; a cabeça que representa de 12 a 13,5%, dos exemplares grandes normalmente é utilizada como troféu pelos pescadores e comunidades no interior e as carcaças utilizadas na elaboração de silagem como alimentação alternativa de animais (ONO et al., 2004, OLIVEIRA, 2007) e para a elaboração de substâncias com elevado teor proteico que têm a finalidade de enriquecer alimentos com baixo teor proteico e especialmente para aqueles que são alérgicos às proteínas do leite (CARVALHO et al., 2015).

2.3. Resíduos de pescado como fonte de biomoléculas

A produção de diferentes espécies de peixes tem gerado durante décadas uma enorme quantidade de resíduos e/ou subprodutos provocando perdas econômicas e contaminação do

ambiente os quais são responsáveis por 50-70g/100g de seu peso total (KITTIPIHATTANABAWON et al., 2005) mas dependendo da cultura e país esses resíduos podem ser considerados como resíduos ou iguarias com elevado preço (TOLDRÁ et al., 2012); no entanto, a maioria desses subprodutos não são adequados para consumo humano (JAYATHILAKAN et al., 2012).

Por ser o pescado um alimento rico em proteínas os resíduos gerados após o beneficiamento tem levado a muitos pesquisadores aproveitá-los para a geração de biomoléculas, tais como o colágeno considerado um dos biomateriais mais usados na ampla gama de aplicações industriais (KIMURA et al., 1987; NAGAI et al., 2002; LI et al., 2013; LAFARGA e HAYES, 2014; KAEWDANG et al., 2014; MAHBOOB, 2015; KITTIPIHATTANABAWON et al., 2015), quitina e quitosana (ZAKU et al., 2011; TAKARINA et al., 2017), gelatina (GÓMEZ-GUILLÉN et al., 2009), tripsina (BEZERRA et al 2001; COSTA et al., 2014) entre outros; aumentando o interesse desses resíduos como fonte de biomoléculas contribuindo com a diminuição da poluição ambiental assim como o melhoramento económico (BEZERRA et al., 2005). No caso do pirarucu somente tem sido aproveitado para outros fins diferentes à produção de biomoléculas, o qual torna atrativo explorar esses resíduos (aprox. 30%) produzidos da sua produção e comércio para obter biomoléculas de interesse industrial, por exemplo, o colágeno.

2.4. Colágeno

Os colágenos são proteínas heterotriméricas com uma massa molecular de 300 kDa, estabilizada por pontes de hidrogênio e por ligações moleculares, formadas por três cadeias peptídicas individuais (Fig 4) cuja característica principal estrutural é a sua tripla hélice formada pelo enrolamento dessas três cadeias polipeptídicas e cada cadeia formada por uma unidade tripeptídica Glicina- X- Prolina ou Glicina – X- Hidroxiprolina onde X pode ser qualquer um dos vinte (20) aminoácidos – padrão distintas, chegando a formar o procolágeno para que finalmente se autoagrupem em fibrilas de colágeno e mantidas juntas formam as fibras de colágeno (BAYNES, 2015).

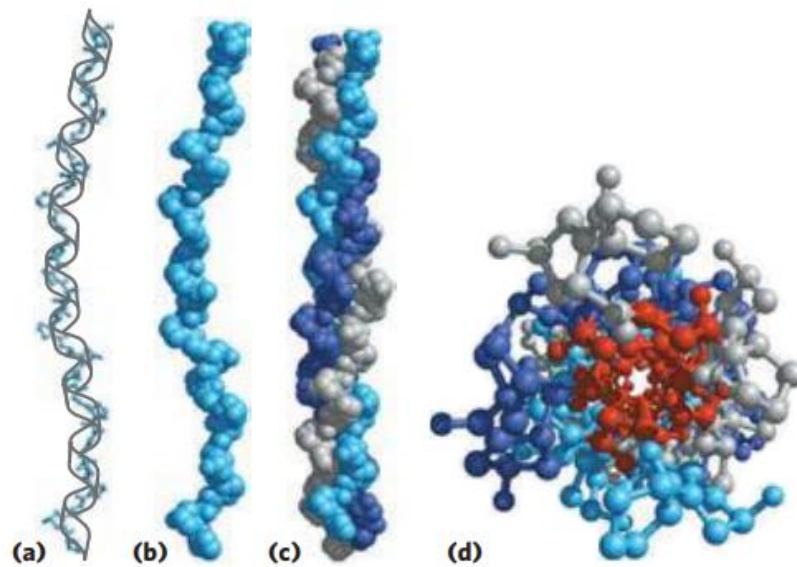


Figura 4. Estrutura do colágeno. (a) A cadeia α do colágeno tem uma estrutura secundária repetitiva que é única desta proteína. A sequência tripeptídica que se repete Glicina- X- Prolina ou Glicina – X- Hidroxiprolina adota uma estrutura helicoidal anti-horária com três resíduos por volta. A sequência repetida para gerar este modelo é a Glicina-Prolina-4-Hip. (b) Modelo de volume atômico da mesma cadeia α . (c) Três destas hélices (mostradas aqui em cinza, azul e roxo) se enrolam uma sobre as outras, no sentido horário. (d) A super-hélice de colágeno formada por três cadeias, mostrada a partir de uma das extremidades, está representada em um modelo de esfera e bastão. Os resíduos de Glicina são mostrados em vermelho. A glicina, por ser pequena, é necessária para uma junção firme na região onde as três cadeias estão em contato. As esferas nesta ilustração não representam os raios de van der Waals dos átomos individuais. O centro da super-hélice de três cadeias não é oco, como aparece aqui, mas sim firmemente compacto. Fonte: NELSON & COX, 2014 – PDB ID 1CGD.

Na atualidade existe pelo menos 29 tipos de colágeno que foram identificados e cada um difere consideravelmente na sequência de aminoácidos, estrutura e função; mas provavelmente também se deva às associações de variantes genéticas específicas (LIU et al., 2012) pois variam na sua distribuição, organização e função nos tecidos, sendo consequentemente os principais componentes do tecido conjuntivo como a cartilagem, os tendões, a matriz orgânica dos ossos e a córnea dos olhos (BAYNES, 2015). Alguns dos tipos de colágenos mais representativos estão listados no Quadro 1.

Cada tipo de colágeno é classificado pelo seu tamanho, função e distribuição, distinguindo-se na sua composição de aminoácidos para manter a estabilidade e integridade estrutural dos tecidos correspondentes e órgãos (HASHIM et al., 2015; LIU et al., 2012).

As proteínas colagenosas podem ser divididas em dois tipos principais: os colágenos formadores de fibrila (fibrilares) e os colágenos não fibrilares. Os colágenos fibrilares são os que conferem força (tensão) aos tendões, ligamentos e pele (Tipos I, II, III, V e XI). Os colágenos não fibrilares ou formadores de rede, são componentes estruturais importantes das membranas basais (BAYNES et al., 2015).

Quadro 1. Principais tipos de colágeno no organismo e desordens associados.

Tipo	Classe	Distribuição	Desordens associados
I	Fibrilar	Amplamente distribuído, incluindo pele, tendões, ossos e coração	Osteogênese Imperfeita, Síndrome de Ehlers-Danlos.
II	Fibrilar	Cartilagem, córnea em desenvolvimento e humor vítreo	Colagenopatia
III	Fibrilar	Tecido conjuntivo extensível, p. ex., pele, pulmão e sistema vascular	Síndrome de Ehlers-Danlos
IV	Rede	Membranas basais, rim e parede vascular	Síndrome de Alport
V	Fibrilar	Fígado, córnea e mucosa	Síndrome de Ehlers-Danlos (clássico)
VI	Filamentos com domínios globulares	Maioria dos tecidos conjuntivos	Miopatia Ullrich e miopatia de Bethlem
IX	*Facit	Cartilagem, humor vítreo	
XI	Formador de fibrila	Cartilagem, osso, placenta	Colagenopatia
XII	*Facit	Tendão embrionário, pele	-
XIII	Com domínio transmembrana	Amplamente distribuído	-
XIV	*Facit	Pele fetal e tendões	-

*FACIT, colágenos associados à fibrila com triplas hélices interrompidas.

Fonte: BAYNES et al. (2015) com algumas modificações.

Tem sido demonstrado que existe variação no colágeno quanto à sua composição de aminoácidos, especialmente da prolina e hidroxiprolina. O teor de prolina e hidroxiprolina é importante pelo seu efeito gelificante, entretanto, considera-se que a hidroxiprolina desempenha um papel importante na estabilização térmica da hélice do colágeno (PIHLAJANIEMI e REHN, 1995). A glicina, prolina e hidroxiprolina são considerados os aminoácidos mais importantes no colágeno (50% do conteúdo total de proteína) (HASHIM et al., 2015) e foi observado que a sequência desses aminoácidos (Glicina-Prolina-Hidroxiprolina) é um dos principais fatores que afetam a termo estabili-

dade do colágeno (GÓMEZ-GUILLÉN et al., 2011). A composição média de aminoácidos de pele para peixe e mamífero é dada no Quadro 2.

Quadro 2. Composições médias de aminoácidos em peles de mamíferos e peixes ósseos (SZPAK, 2011).

Aminoácido	Abundância na pele de mamíferos (resíduos/1000)	Abundância na pele de peixes (resíduos/1000)
Glicina	329	339
Prolina	126	108
Alanina	109	114
Hidroxiprolina	95	67
Ácido glutâmico	74	76
Arginina	49	52
Ácido aspártico	47	47
Serina	36	46
Lisina	29	26
Leucina	24	23
Valina	22	21
Treonina	19	26
Fenilalanina	13	14
Isoleucina	11	11
Hidroxilisina	6	8
Metionina	6	13
Histidina	5	7
Tirosina	3	3
Cisteína	1	1
Triptófano	0	0

2.5. Fontes de obtenção do colágeno

O file ou diferentes tipos de cortes nas carnes são produtos do abate dos animais, e o restante, vísceras e miudezas estão dentro da classificação dos subprodutos e entre eles estão os ossos, tendões, peles, tecidos gordurosos, cascos, pés, sangue e órgãos internos e, a quantidade dos subprodutos gerados vai depender da espécie, sexo, idade e peso do corpo do animal (BHASKAR et al., 2007).

Dependendo da cultura e país, subprodutos comestíveis, podem ser considerados como resíduos ou iguarias com elevado preço (TOLDRA et al., 2012). No entanto, a maioria dos subprodutos não são adequados para consumo humano (JAYATHILAKAN et al., 2012). O processamento daqueles subprodutos pode tornar um produto de baixo valor em um produto que é capaz de cobrir todos os custos de tratamento e investimento, com consequente maior valor agregado e reduzir os danos ambientais (TOLDRA et al., 2012). Em zonas pesqueiras, como na Amazônia, o aproveitamento desses subprodutos vão gerar melhores ingressos de renda para as

peças que dependem da pesca, assim como para as indústrias, que ao mesmo tempo de ter ganhos econômicos estarão apoiando ao crescimento socioeconômico e manejo sustentável dos recursos pesqueiros, diminuindo ao mesmo tempo a poluição ambiental.

A importância do consumo de colágeno está em manter os músculos da pele firmes diminuindo assim o processo de envelhecimento, elevar a densidade dos ossos, elasticidade e força das articulações e ligamentos, pois sua carência ou síntese anormal, pode causar distúrbios metabólicos e genéticos (o escorbuto, a osteogênese imperfeita e a síndrome de Ehlers-Danlos (BAYNES et al., 2015); além do que o risco da transmissão de doenças como Encefalopatia Espongiforme Bovina (EEB), Encefalopatia Espongiforme Transmissível (EET), Febre Aftosa (FA) (KITTIPIHATTA-NABAWON et al., 2005) conhecidas como zoonoses, o estilo de vida, a prevenção de doenças (WU et al., 2012; CARDINALE et al., 2015) e a convicção religiosa de Muçulmanos, Judeus e alguns cristãos que acreditam que não se deve comer suínos torna-se necessário buscar fontes alternativas dessa proteína e uma destas fontes são efetivamente os organismos aquáticos, uma alternativa atraente (SADOWSKA et al., 2003), o qual foi motivo de interesse de muitos pesquisadores (Quadro3).

2.6 Usos e aplicações do colágeno

O colágeno é considerado um dos biomateriais mais usados por ter uma ampla gama de aplicações industriais (LAFARGA e HAYES, 2014). Na indústria dos alimentos a demanda é alta devido a seu conteúdo proteico e suas propriedades funcionais (capacidade de absorção de água, formação de gel e, sua capacidade de formar e estabilizar emulsões) formando parte dessa indústria como suplementos ou aditivos, formação de filmes e revestimentos comestíveis (HASHIM et al., 2015). Na área da biomedicina e farmacêutica serve como material que contém o fármaco, proteínas e genes, como também pode substituir a pele do homem, vasos sanguíneos e ligamentos (KIM e MENDIS, 2006; GÓMEZ-GUILLÉN et al., 2011); por tais motivos na indústria cosmética é muito usado o colágeno para a prevenção e diminuição de rugas, géis, mascarilhas, injeções cutâneas, tratamentos para o cabelo com o fim de evitar a sua queda e fraqueza ou também, melhorar sua aparência deixando mais saudável.

Quadro 3. Colágeno extraído de várias espécies de peixes.

Espécie	Fonte	Autor
Caroa Índia (<i>Catla catla</i>) e Mrigal (<i>Cirrhinus mrigala</i>)	Escamas, pele e barbatanas	MAHBOOB, 2015
<i>Chitala ornata</i>	Pele	KITTIPHATTANABAWON et al., 2015
Tilápia do Nilo (<i>Oreochromis niloticus</i>)	Escamas	EL-RASHIDY AIAH et al., 2015
Tilápia, carpa herbívora e carpa gris	Pele	TANG et al., 2015
<i>Atum albacora</i> (<i>Thunnus Albacares</i>)	Bexiga	KAUSDANG et al., 2014
<i>Cioba</i> (<i>Lutjanus analis</i>)	Pele	NERI, 2013
<i>Scomberomorus niphonius</i>	Pele e osso	LI et al., 2013
Carpa de cabeça grande (<i>Hypophthalmichthys nobilis</i>)	Aletas, escamas, ossos e bexiga nata-tórias	LIU et al., 2012
<i>Cobia</i> (<i>Rachycentron canadum</i>)	Pele	COSTA, 2012
Peixe – porco (<i>Aluterus monóceros</i>), Atka - cavala (<i>Pleurogrammus azonus</i>) e Albacora (<i>Thunnus alalunga</i>)	Pele	NALINANON et al., 2010, 2011
Tubarão (<i>Chiloscyllium punctatum</i>)	Pele	KITTIPHATTANABAWON et al., 2010
<i>Hypomesus pretiosus japonicus</i> Brevoort	Pele	NAGAI et al., 2010
<i>Priacanthus tayenus</i> e <i>Priacanthus macracanthus</i>	Pele	BENJAKUL et al., 2010
Carpa comum (<i>Cyprinus carpio</i>)	Pele, escamas e ossos	DUAN et al., 2009
Peixe vermelho (<i>Sebastes mentella</i>)	Pele	WANG et al., 2007
Catalufa pintada (<i>Priacanthus tayenus</i>)	Pele e osso	KITTIPHATTANABAWON et al., 2005
Miraguaia (<i>Pogonia cromis</i>) e Sargo de dente (<i>Archosargus probatocephalus</i>)	Ossos e escamas	OGAWA et al., 2004
Pargo vermelho (<i>Pagrus major</i>) e Tilápia do Nilo (<i>Oreochromis niloticus</i>)	Escamas	IKOMA et al., 2003
Cod (<i>Gadus morhua</i>)	Pele	SADOWSKA et al., 2003
Torafugu (<i>Takifugu rubripes</i>)	Pele	NAGAI et al., 2002
Merluza (<i>Merluccius hubbsi</i>)	Pele	CIARLO et al., 1997
Carpa comum (<i>Cyprinus carpio</i>)	Escamas e ossos	KIMURA et al., 1991
Teleósteos	Pele	KIMURA et al., 1987

Na área médica o colágeno tem aplicações cardíacas, cirurgia estética, enxertos ósseos, regeneração de tecidos, usos cirúrgicos reconstrutivos e tratamentos de feridas (OLIVEIRA, 2010); foi evidenciado o uso do colágeno para o tratamento de feridas em forma de filmes (ALBANNA e HOLMES IV, 2016) ajudando na cicatrização e incentivando a formação do tecido conjuntivo devido à similaridade histológica e propriedades mecânicas do colágeno presente na pele humana (NORBURY et al. 2016; MATHANGI et al. 2013). Responsáveis da similaridade poderiam ser a presença dos aminoácidos Glicina, Prolina e hidroxiprolina em porcentagens próximas ao da pele humana (Quadro 4).

Quadro 4. Conteúdo de aminoácidos do colágeno tipo 1 na pele humana e do pescado.

Aminoácido	%Aminoácido em colágeno Tipo I (pele humana)	%Aminoácido em colágeno Tipo I (pele de pescado)
Alanina	11	11.9
Arginina	5	5.8
Asparagina	5	4.2
Glutamina	7	6.9
Glicina	33	35.6
Histidina	0.5	0.6
Isoleucina	1	0.8
Leucina	2	2
Lisina	2	2
Metionina	0.6	0.5
Fenilalanina	1	1.3
Prolina	13	12.8
Serina	4	3.2
Treonina	2	2.2
Triptofano	2	0
Tirosina	0.3	0.3
Valina	2	2
4-hidroxiprolina	8.6	8.2
Total	100	100

Fonte: Serrano (2011)

No campo da veterinária alguns estudos mostraram eficácia na suplementação de colágeno com outros nutracêuticos para cães com osteoartrite (GUPTA et al., 2012). Na indústria de bebidas alcoólicas são utilizados como clarificadores os colágenos extraídos de bexiga natatória de peixes tropicais na forma de pó e sendo adicionados à bebida a qual começa a ter uma sedimentação que é removida do fundo do recipiente (HICKMAN et al., 2000). Em, alguns países como a China, a bexiga natatória é muito apreciada pois é utilizada como alimento e, nos Estados Unidos e Alemanha a utilizam para produzir cola (COELHO, 2014).

2.7 Caracterização do colágeno

Após obter o colágeno, independente de como foi seu processo de extração, são realizadas diferentes tipos de análises entre elas: aplicação da técnica de eletroforese com gel de poliacrilamida com dodecil sulfato sódio (PAGE-SDS), espectrofotometria de infravermelho com transformada de Fourier (FT-IR), determinação da temperatura de desnaturação, aminograma e outros análises; com a finalidade de mostrar a pureza e integridade da molécula do colágeno.

2.7.1 Eletroforese em gel de poliacrilamida (PAGE-SDS)

A técnica de eletroforese em gel de poliacrilamida com SDS, ajuda a detectar com base no peso molecular, se o que foi extraído é realmente colágeno. A técnica consiste em utilizar um detergente desnaturante, o dodecil sulfato de sódio (SDS) geralmente utilizado na técnica de eletroforese em gel de poliacrilamida (PAGE) para separar e diferenciar as subunidades proteicas onde os poros do gel de poliacrilamida outorga a seletividade para as proteínas com pesos moleculares diferentes, usando corantes sensíveis e específicos, como o azul de Coomassie, ou com a técnica de coloração por prata (BAYNES, 2015).

Vários autores (OGAWA et al., 2004; JONGJAREONRAK et al., 2005; SKOPINSKA-WISNIEWSKA et al., 2016) tem reportado ao colágeno como um heteropolímero com peso molecular de aproximadamente 300kDa com bandas proteicas claramente diferenciadas entre si. No gel de poliacrilamida com SDS pode ser visualizada a presença da cadeia γ característica de um colágeno nativo com peso molecular de aproximadamente acima dos 200kDa, enquanto as cadeias β e α podem ser visualizadas com um peso molecular aproximadamente abaixo dos 200kDa, o qual são características do colágeno do tipo I.

2.7.2 Espectrofotometria de infravermelho com transformada de Fourier (FT-IR)

Autores (VIDAL, B. D.; MELLO, M. L. S., 2011) reportaram por meio dessa técnica a possibilidade de prever e confirmar o estado da estrutura da tripla hélice do colágeno assim como a assinatura molecular característica dele o qual está representada pelo espectro formado devido às vibrações moleculares dos grupos funcionais presentes na amostra, cujo termo Transformada de Fourier refere-se ao fato de que um algoritmo de transformada de Fourier é necessário para transformar os dados brutos nesse espectro.

Por meio do cálculo do rácio de absorção entre o a amida III (cm^{-1}) e 1454 (cm^{-1}) é possível determinar se a estrutura do colágeno permaneceu estável ou intacta pois tem sido reportado que valores de rácio de absorção de aproximadamente 1 sugerem que a estrutura da tripla hélice do colágeno

está estável (LIU et al, 2015) sendo considerada a espectrofotometria de infravermelho com transformada de Fourier (FT-IR) por vários autores (KITTIPIHATTANABAWON et al., 2010), uma técnica simples e prática para avaliar a estrutura molecular do colágeno.

2.7.3 Temperatura de desnaturação

Dependendo do método utilizado, o princípio da determinação da temperatura de desnaturação (Td) está baseado em poder saber em qué temperatura o colágeno perde sua estabilidade térmica, ou seja a quebra dos pontes de hidrogênio e ligações intermoleculares responsáveis da sua estabilidade molecular.

Por definição temos que a temperatura de desnaturação é aquela temperatura na qual o colágeno apresenta mudanças irreversíveis na sua estrutura molecular sendo observada essas mudanças em uma das suas propriedades físicas, a viscosidade (SHAHIRI et al., 2012). Geralmente essa viscosidade é calculada considerando a Td aquela temperatura na qual o colágeno perde 50% da sua viscosidade ou 0,5 da sua viscosidade fracional (ZHU e KIMURA, 1991).

Para muitos autores a temperatura de desnaturação está relacionada à estabilidade térmica do colágeno o qual está relacionada ao hábitat e temperatura do corpo; e da mesma forma a temperatura de desnaturação (Td) de uma mesma espécie pode ser apresentada com pequenas variações devido ao método utilizado para medir ela (TAN- CHANG, 2018); portanto poderia ser afirmado que a temperatura de desnaturação de colágenos de peixes de águas temperadas será sempre menor que a temperatura de desnaturação dos peixes de águas tropicais (TAKAHASHI E YOKOYAMA, 1954; LIU et al, 2015).

Foi reportado Td com valores similares e diferentes apartir de várias espécies de peixes: 24,6°C para *Theragra chalcogramma* (YAN et al., 2008), 28°C para *Cyprinus carpio* (DUAN et al., 2009), 32°C para *Oreochromis niloticus* (SUJITHRA et al., 2013) e 36,5°C para *Ctenopharyngodon idella* (LIU et al, 2015).

2.7.4 Solubilidade do colágeno

A solubilidade de uma proteína pode ser manifesta mediante a relação proteína- solvente sendo as características hidrofóbicas e iônicas da proteína aquelas que têm maior influência na sua solubilidade (DAMODARAN, 1996). A maioria das proteínas alimentares são proteínas ácidas é por isso que o colágeno é conhecido por ser mais solúvel em valores de pH ácidos mas a diminuição dessa solubilidade é devido porque o colágeno atingiu o seu ponto isoelétrico (PI), entre valores de pH 6-9 (FOEGEDING et al., 1996) ou seja nesse valor de pH considerado o PI a proteína perde a

sua solubilidade tornando ela não solúvel por causa das interações hidrofóbicas entre as moléculas do colágeno (DAMODARAN, 1996, JONGJAREONRAK et al., 2005).

O colágeno também é conhecido por ser não muito tolerável ao sal, o qual é evidenciado na diminuição da sua solubilidade a causa das interações hidrofóbicas e, o incremento da sua solubilidade é devido ao decréscimo da atividade iônica na proteína (ASGHAR E HENRICKSON, 1982; VOJDANI,1996). Segundo a fonte de obtenção do colágeno as propriedades moleculares do colágeno pode variar; por exemplo, colágeno ácido solúvel (ASC) é mais susceptíveis a uma rápida perda de solubilidade em maiores concentrações de NaCl, diferente do colágeno pepsino solúvel (PSC) o qual devido à pepsina, são os que promovem a hidrólise nas zonas de maior entrecruzamentos entre as moléculas de alto peso molecular (SINGH et al., 2011).

3. OBJETIVOS

3.1. Geral

Extrair e caracterizar colágeno ácido solúvel (ASC) de resíduos da pele do pirarucu (*Arapaima gigas*).

3.2. Específicos

- Extrair colágeno ácido solúvel (ASC) das peles do pirarucu;
- Determinar o rendimento da extração do colágeno;
- Determinar o tipo de colágeno obtido através de eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE);
- Determinar a melhor solubilidade relativa do colágeno obtido quanto às variações de pH e concentrações de NaCl;
- Determinar a temperatura de desnaturação do colágeno;
- Avaliar fisicamente o colágeno obtido através da espectroscopia na região do infravermelho.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALBANNA, M.; HOLMES, J. H. IV. Skin Tissue Engineering and Regenerative Medicine, 1st Edition. 2016. Medical Center Boulevard Winston-Salem, NC, USA. Academic Press is an imprint of Elsevier. ISBN:978-0-12-801654-1.
- BATISTA, V. S.; INHAMUNS, A. J.; FREITAS, C. E. C.; BRASIL, D. F. Characterization of the fishery in river communities in the low-solimões/high-amazon region.. Fisheries Management and Ecology, Reino Unido, v. 5, p. 419-435, 1998.
- BAYNES, J. W.; DOMINICZAK, M. H. Bioquímica Médica. Tradução da 4ª edição. Saunders Elsevier. capítulo 29, 2015.
- BENJAKUL, S.; THIANILAKUL, Y.; VISESSANGUAN, W.; ROYTRAKUL, S.; KISHIMURA, H.; PRODPRAN, T.; MEESANE, J. Extraction and characterization of pepsin solubilized collagens from the skin of bigeye snapper (*Priacanthus tayenus* and *Priacanthus macracanthus*). Journal of the Science of Food and Agriculture, 90, 132-138, 2010.
- BEZERRA, R. S., SANTOS, J. F., PAIVA, P. M. G., CORREIA, M. T. S., COELHO, L. C. B. B., VIEIRA, V. L. A. & CARVALHO JR, L. B. Partial purification and characterization of a thermostable trypsin from pyloric caeca of tambaqui (*Colossoma macropomum*). Journal of Food Biochemistry, 25, 199–210, 2001.
- BEZERRA, R. S.; LINS, E. J.F.; ALENCAR, R. B.; PAIVA, P. M.G.; CHAVES, M. E.C.; COELHO, L. C.B.B.; CARVALHO, L. B. Alkaline proteinase from intestine of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). Process Biochemistry, v. 40, p. 1829-1834, 2005.
- BHASKAR, N. E. S.; SUDEEPA, H. N.; RASHMI, A.; TAMIL S. Partial purification and characterization of protease of *Bacillus proteolyticus* CFR3001 isolated from fish processing waste and its antibacterial activities. Biores. Technol., 98, 2758-64, 2007.
- BRASIL RURAL, FAO: Consumo de pescado no Brasil está no patamar mundial de 1960. Publicado em 01/09/2017 - 13:58. Disponível em <http://radios.ebc.com.br/brasil-rural/2017/09/brasil-consume-mesma-quantidade-de-pescado-que-o-mundo-comia-em-1960> Acesso em 08 de março de 2018.

CARDINALE, E.; ABAT, C.; BÉNÉDICTE, C.; VINCENT, P.; MICHEL, R.; MURIEL, M. *Salmonella* and *Campylobacter* contamination of ready-to-eat street-vended pork meat dishes in antananarivo, madagascar: A risk for the consumers?. *Foodborne Pathogens and Disease*, Vol.12(3), pp.197-202, 2015.

CASTELLO, L. Lateral migration of *Arapaima gigas* in floodplains of the amazon. *Ecology of Freshwater Fish*, v. 17, p. 38–46, 2008.

CASTELLO, L.; STEWART, D. J. Assessing CITES non-detriment findings procedures for arapaima in Brazil. *Journal of Applied Ichthyology*, v. 26, p. 49-56, 2010.

CASTELLO, L.; STEWART, D. J.; ARANTES, C. C. O que sabemos e precisamos fazer a respeito da conservação do pirarucu (*Arapaima* spp.) na Amazônia. In: AMARAL, E. S. *Biologia, conservação e manejo participativo de pirarucus na Pan- Amazônia*. Tefé: IDSM, p. 278, 2013.

CASTELLO, L.; ARANTES, C. C.; MCGRATH, D. G.; STEWART, D. J.; SOUSA, F. S. Understanding fishing-induced extinctions in the Amazon. *Aquatic Conserv: Mar. Freshw. Ecosyst*, p. 12, 2014.

CAVERO, B. A. S.; FONSECA, F. A. L. Pirarucu: situação atual e perspectivas na região amazônica. *Panorama da Aquicultura*, 2016. (www.panoramadaaquicultura.com.br). Acesso em 10/04/2018.

CIARLO, A. S.; PAREDI, M. E.; FRAGA, A. N. Isolation of soluble collagen from hake skin (*Merluccius hubbsi*). *Journal of Aquatic Food Product Technology*, 6, p. 65–77, 1997.

COELHO, R. O ouro do pescado. *Tribuna Amapaense*. Jornal semanal, editado em Macapá. Publicado o Abril 11, 2014. Disponível em:

<http://tribunaamapaense.blogspot.com.br/2014/04/grude-da-gurijuba-o-ouro-do-pescado.html>.

Acesso no 08 de março de 2018.

COSTA, H. M. S. Extração, purificação e caracterização de proteínas de interesse industrial a partir de resíduos do processamento dos peixes bijupirá (*Rachycentron canadum*), pirarucu (*Arapaima gigas*) e xáreu (*Caranx hippos*). Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Bioquímica e Fisiologia da Universidade Federal de Pernambuco. Recife. 2012.

COSTA, H.M.S.; FREITAS JÚNIOR, A.C.V.; AMARAL, I.P.G.; HIRATA, I.Y.; PAIVA, P.M.G.; CARVALHO JR.; OLIVEIRA, L.B. V.; BEZERRA, R.S. Metal-sensitive and thermostable trypsin from the crevalle jack (*Caranx hippos*) pyloric caeca: purification and characterization Chem. Cent. J., 7, p. 166-173, 2013.

COSTA, H.P.S.; OLIVEIRA, J.T.A.; SOUSA, D.O.B.; MORAIS, J.K.S.; MORENO, F.B.; MONTEIRO-MOREIRA, A.C.O.; VIEGAS, R.A.; VASCONCELOS, I.M. JcTI-I: a novel trypsin inhibitor from *Jatropha curcas* seed cake with potential for bacterial infection treatment. *Frontiers in Microbiology* 5: 1-12. 2014.

DAMODARAN SRINIVASAN (1996). Amino Acids, Peptides, and Proteins. In O. R. Fennema (Ed.), *Food chemistry* (pp. 329). New York: Marcel Dekker.

DUAN, R.; ZHANG, J.; DU, X.; YAO, X.; KONNO, K. Properties of collagen. in E. M. Marata; B. S. Schweigert (Eds.). *Advances in food research* (pp. 237e273). London: Academic Press. 2009.

EL-RASHIDY, A. A. *et al.* Chemical and biological evaluation of Egyptian Nile Tilapia (*Oreochromis niloticus*) fish scale collagen. *International Journal of Biological Macromolecules*. Volume 79, August 2015, p. 618–626, 2015.

FAO. The State of World Fisheries and Aquaculture 2016. Rome, parte I, 2016.

FOEGEDING, E., LANIER, T. C., & HULTIN, H. O. (1996). Characteristics of edible muscle tissue. In O. R. Fennema (Ed.), *Food chemistry* (pp. 879e942). New York: Marcel Dekker.

FREITAS-JÚNIOR, *et al.* Giant Amazonian fish pirarucu (*Arapaima gigas*): Its viscera as a source of thermostable trypsin. *Food Chemistry*, v. 133, p. 1596-1602, 2012.

GOMEZ-GUILLEN, *et al.* Structural and physical properties of gelatin extracted from different marine species: A comparative study. *Food Hydrocolloids*, v. 16, p. 25-34, 2002.

GOMEZ-GUILLEN, M.C.; PÉREZ-MATEOS, M.; GOMEZ-ESTACA, J.; LOPEZ-CABALLERO, E.; GIMENEZ, B.; MONTERO, P. Fish gelatin: a renewable material for developing active biodegradable films. *Trends in Food Science & Technology*. 20, p.3-16, 2009.

GÓMEZ-GUILLÉN, M. C.; GIMÉNEZ, B.; LÓPEZ-CABALLERO, M. A.; MONTERO, M. P. Functional and bioactive properties of collagen and gelatin from alternative sources: A review. *Food Hydrocolloids* 25(8):1813-1827, 2011.

GUPTA, R. C.; CANERDY, T. D.; LINDLEY, J.; KONEMANN, M.; MINNIEAR, J.; CARROLL, B. A.; HENDRICK, C.; GOAD, J. T.; ROHDE, K.; DOSS, R.; BAGCHI, M.; BAGCHI, D. Comparative therapeutic efficacy and safety of type-II collagen (UC-II), glucosamine and chondroitin in arthritic dogs: Pain evaluation by ground force plate. *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition*. 96 (5):770–7, 2012.

HASHIM, P.; MOHD RIDZWAN, M. S.; BAKAR, J.; MAT HASHIM, D. Collagen in food and beverage industries. *International Food Research Journal* 22(1): 1 – 8, 2015.

HICKMAN, D.; SIMS, T. J.; MILES, C. A.; BAILEY, A. J.; DE MARI, M.; KOOPMANS, M. Isinglass/collagen: Denaturation and functionality. *Journal of Biotechnology*, v. 79, p. 245–257, 2000.

ICMBio .Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade. MINISTÉRIO DO MEIO AMBIENTE. Manejo do pirarucu gera renda na Amazônia. Publicado: Quinta, 05 de Janeiro de 2017, 10h41. Disponível em : <http://www.icmbio.gov.br/portal/ultimas-noticias/20-geral/8634-manejo-do-pirarucu-gera-renda-para-comunidades-na-amazonia>. Acesso em 07 de março de 2018.

IKOMA, T. ; KOBAYASHI, H.; TANAKA, J.; WALSH, D.; MANN, S. Physical properties of type I collagen extracted from fish scales of *Pagrus major* and *Oreochromis niloticus*. *International Journal of Biological Macromolecules*. v. 32, p. 199-204, 2003.

JAYATHILAKAN, K.; SULTANA, K.; RADHAKRISHNA, K.; BAWA, A. Utilization of by-products and waste materials from meal, poultry and fish processing industries: a review. *J. Food Sci. Technol.* 49 (3): 278-293, 2012.

JONGJAREONRAK, A.; BENJAKUL, S.; VISESSANGUAN, W.; TANAKA, M. Isolation and characterization of collagen from bigeye snapper (*Priacanthus marcracanthus*) skin. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. v. 85, p. 1203–1210, 2005a.

KAEWDANG, O.; BENJAKUL, S.; KAEWMANEE, T.; KISHIMURA, H. Characteristics of collagens from the swim bladders of yellowfin tuna (*Thunnus albacares*). Food Chemistry. v. 155, p. 264-270, 2014.

KIM, S. E.; MENDIS, E. Bioactive compounds from marine processing byproducts – a review. Food Research International. 39(4):383-393, 2006.

KIMURA, K.; MIYAUCHI, Y.; UCHIDA, N. Scale and bone type I collagen of carp (*Cyprinus carpio*). Comparative biochemistry and physiology. 99B (2), p. 473–476, 1991.

KIMURA, S.; OHNO, Y.; MIYAUCHI, Y.; UCHIDA, N. Fish skin type I collagen: Wide distribution of an $\alpha 3$ subunit in teleosts. Comp Biochem Physiol. 88(B):27–34, 1987.

KITTIPHATTANABAWON, P.; BENJAKUL, S.; VISESSANGUAN, W.; NAGAI, T.; TANAKA, M. Characterization of acid-soluble collagen from skin and bone of bigeye snapper (*Priacanthus tayenus*). Food Chemistry. v. 89, p. 363–372, 2005.

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 Chemistry. vol. 119, no. 4, p.1519–1526, 2010.

KITTIPHATTANABAWON, P.; BENJAKUL, S.; SINTHUSAMRAN, S.; KISHIMURA, H. Characteristics of collagen from the skin of clown featherback (*Chitala ornata*). International Journal of Food Science and Technology. 50(9): 1972-1978, 2015.

LAFARGA, T.; HAYES, M. Bioactive peptides from meat muscle and by-products: generation, functionality and application as functional ingredients. Meat Science. 98(2): 227-239, 2014.

LI, Z.; WANG, B.; CHI, C.; ZHANG, Q.; GONG, Y.; TANG, J.; LUO, H.; DING, G. Isolation and characterization of acid soluble collagens and pepsin soluble collagens from the skin and bones of Spanish mackerel (*Scomberomorus niphonicus*). Food Hydrocolloids. v. 31, p. 103-113, 2013.

LIU, D.; LIANG, L.; REGENSTEIN, J. M.; ZHOU, P. Extraction and characterization of pepsin-solubilised collagen from fins, scales, skins, bones and swim bladders of bighead carp (*Hypophthalmichthys nobilis*). Food Chemistry. 133, 1441-1448, 2012.

MAHBOOB, S. Isolation and characterization of collagen from fish waste material- skin, scales and fins of *Catla catla* and *Cirrhinus mrigala*. Journal of Food Science and Technology-Mysore. 52(2): 4296-4305, 2015.

MATHANGI RAMAKRISHNAN K, BABU M, MATHIVANAN, JAYARAMAN V, SHANKAR J. (2013). Advantages of collagen based biological dressings in the management of superficial and superficial partial thickness burns in children. Ann Burns Fire Disasters. 26(2): 98–104.

MIRANDA-CHUMACERO, G.; WALLACE, R.; CALDERÓN, H.; CALDERÓN, G.; WILLINK, P.; GUERRERO, M.; SILES, T. M.; LARA, K.; CHUQUI, D. Distribution of *Arapaima* (*Arapaima gigas*) (Pisces: Arapaimatidae) in Bolivia: implications in the control and management of a non-native population. BioInvasions Records. v. 1, n. 2, p. 129-138, 2012.

NAGAI, T.; ARAKI, Y.; SUZUKI, N. Collagen of the skin of ocellate puffer fish (*Takifugu rubripes*),” Food Chemistry. Vol. 78, No. 2, p. 173-177, 2002.

NAGAI, T. *et al.* Characterization of acid- soluble collagen from skins of surf smelt (*Hypomesus pretiosus japonicus*). Food and Nutrition Sciences. 1, 59-66, 2010.

NALINANON, S.; BENJAKUL, S.; KISHIMURA, H. Collagens from the skin of arabesque greenling (*Pleurogrammus azonus*) solubilized with the aid of acetic acid and pepsin from albacore tuna (*Thunus alalunga*) stomach. Journal of the Science of Food and Agriculture. v. 90, p.1492-1500, 2010.

NALINANON, S.; BENJAKUL, S.; KISHIMURA, H.; OSAKO, K. Type I collagen from the skin of ornate threadfin bream (*Nemipterus hexodon*): Characteristics and effect of pepsin hydrolysis. Food Chemistry, v. 125, p. 500–507, 2011.

NELSON, D.L.; COX, M.M. Princípios de bioquímica de Lehninger. Porto Alegre, Ed. Artmed, 6ª edição, 2014.

- NERI, R. C. A. Extração e caracterização do colágeno obtido a partir do resíduo de processamento da cioba (*Lutjanus analis*). Dissertação apresentada para obtenção do título de Mestre em Bioquímica e Fisiologia pela Universidade Federal de Pernambuco. Recife. 2013.
- NORBURY W, HERNDON DN, TANKSLEY J, JESCHKE MG, FINNERty CC (2016). Infection in Burns. Surgical Infections. Vol. 17(2):250– 255.
- OECO. O que é uma Reserva de Desenvolvimento Sustentável. Publicado 13 de Julho de 2015, 19h24. Disponível em: <http://www.oeco.org.br/dicionario-ambiental/29229-o-que-e-uma-reserva-de-desenvolvimento-sustentavel/> Acesso em 07 de março de 2018.
- OGAWA, M. *et al.* Biochemical properties of bone and scale collagens isolated from the subtropical fish black drum (*Pogonia cromis*) and sheepshead seabream (*Archosargus probatocephalus*). Food Chemistry. v. 88, p. 495-501, 2004.
- OLIVEIRA, P. R. 2007. Qualidade do Pirarucu (*Arapaima gigas*, Shinz 1822) procedente de piscicultura, estocado em gelo, congelado e de sus produtos derivados. Tese de Doutorado, Instituto Nacional de Pesquisa do Amazonas/Universidade Federal do Amazonas, Manaus, Amazonas. 130p.
- OLIVEIRA, S. M.; RINGSHIA, R. A.; LEGEROS, R.Z.; CLARK, E.; YOST, M. J.; TERRACIO, L.; TEIXEIRA, C. C. An improved Collagen Scaffold for Skeletal Regeneration. Journal of biomedical materials research. Part A. 94(2):371-379, 2010.
- OLIVEIRA, P. R.; JESUS, R. S.; BATISTA, M. G.; LESSI, E. Avaliação sensorial, físico-química e microbiológica do pirarucu (*Arapaima gigas*, Schinz 1822) durante estocagem em gelo. Brazilian Journal of Food Technology (Online), v. 17, p. 67-74, 2014.
- ONO, A. E.; HALVERSON, R. M., KUBITZA, F. Pirarucu, o gigante esquecido. Panorama da Aqüicultura Vol. 14, No 81. Jan/fev 2004. Páginas 14 a 25. Disponível em: http://www.acquaimagem.com.br/docs/Pan81_Kubitza.pdf. Acesso em: 08 de março de 2018.
- PEDROZA, M.; PIZARRO, A.; OEDA, A.; PEREIRA, F.; FERREIRA, A.; MATAVEL, M. Panorama da cadeia produtiva do pirarucu. Boletim Ativos da Aquicultura. Ano 2 - Edição 8 - Fevereiro de 2016. Disponível em: <http://empreendendoaquicultura.blogspot.com.br/2016/03/panorama-da-cadeia-produtiva-do-pirarucu.html> Acesso em: 08 de março de 2018.

PEREIRA FILHO, M.; ROUBACH, R. Criação de Pirarucu. In: BALDISSEROTO, B.; GOMES, L. C. (Org.). Criação de Espécies Nativas de Peixes. Santa Maria: UFSM, p. 37-66. Volume único. 2005.

PIHLAJANIEMI T.; REHN M. Two new collagen subgroups: membrane-associated collagens and types XV and XVIII. Progress in Nucleic Acid Research and Molecular Biology, Orlando, v.50, p. 225-61, 1995.

QUEIROZ, H. L.; SARDINHA, A. D. A preservação e o uso sustentado dos pirarucus em Mamirauá. In: QUEIROZ, H.L.; CRAMPTON, W.G.R. (Eds.). Estratégias para o manejo de recursos pesqueiros em Mamirauá. Tefé, Brasil: Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico, Sociedade Civil Mamirauá. p. 108-141, 1999.

REBELATTO JUNIOR, I. A.; LIMA, A. F.; RODRIGUES, A.P.O.; MACIEL, P.O.; KATO, H. C. A.; MATAVELI, M.; REZENDE, F. P.; VARELA, E. S.; SOUSA, A. R. B.; SANTOS, C.; BOIJINK, C. L.; YOSHIOKA, E. T. O.; O’SULLIVAN, F. L. A. Reprodução e engorda do pirarucu: levantamento de processos produtivos e tecnologias. 1. ed. Brasília: Embrapa, 2015. v. 1. 102 p. Disponível em: <http://www.infoteca.cnptia.embrapa.br/infoteca/bitstream/doc/1036701/1/CNPASA2015lv.pdf>. Acesso em: 01 março. 2018.

REVISTA PANORAMA DA AQUICULTURA . Panorama da aquicultura. a história da aquicultura no Brasil. <http://www.panoramadaaquicultura.com.br/novosite/?p=8178>. Acesso 06 de março 2018.

SADOWSKA M.; KOŁODZIEJSKA I.; NIECIKOWSKA, C. Isolation of collagen from the skins of Baltic cod (*Gadus morhua*), Food Chemistry. vol. 81, no. 2, p.257–262, 2003.

SEIBEL, N. F.; SOARES, L. A. S. Produção de silagem química com resíduos de pescado marinho. Brazilian Journal of Food Technology. v. 6, n. 2, p.333 - 337, 2003.

SERRANO J. Estandarización de un proceso de extracción de colágeno a partir de los residuos de fileteo de tilapia (*Oreochromis sp*) y cachama (*Piaractus brachypomus*). Tesis presentada para optar al título de: Magister en Ingeniería Química. Universidad Nacional de Colombia. Facultad de Ingeniería, Área Curricular de Ingeniería Química y Ambiental Bogotá D.C., Colombia. 2011.

SIDONIO, L.; CAVALCANTI, I.; CAPANEMA, L.; MORCH, R.; MAGALHÃES, G.; LIMA, J.; BURNS, V.; ALVES JÚNIOR, A.J.; MUNGIOLI, R. Panorama da aquicultura no Brasil: desafios e oportunidades. BNDES Setorial, v.35, p.421-463, 2012. Disponível em: http://www.polypus.com.br/proenca/curso/artigo_BNDS.pdf. Acesso em: 08 de março de 2018.

SKOPINSKA-WISNIEWSKA, J.; WEGRZYNOWSKA-DRZYMALSKA, K.; BAJEK, A.; MAJ, M.; SIONKOWSKA, A. Is dialdehyde starch a valuable cross-linking agent for collagen/elastin based materials? Journal of Materials Science: Materials in Medicine 2016, 27.

SOUZA, A. F. L.; INHAMUNS, A. J. Análise de rendimento cárneo das principais espécies de peixes comercializadas no Estado do Amazonas, Brasil. Acta Amazônica, v. 41, p. 289-296, 2011.

STEWART, D. J. Re-description of *Arapaima agassizii* (Valenciennes), a rare fish from Brazil (*Osteoglossomorpha*, *Osteoglossidae*). Copeia, v. 2013, n. 1, p. 38-51, 2013a.

STEWART, D. J. A new species of *Arapaima* (*Osteoglossomorpha*, *Osteoglossidae*) from the Solimões River, Amazonas State, Brazil. Copeia, v. 2013, n. 3, p. 470-476, 2013b.

SZPAK, PAUL. Fish bone chemistry and ultrastructure: implications for taphonomy and stable isotope analysis. Journal of Archaeological Science. 38 (12): 3358–3372. 2011.

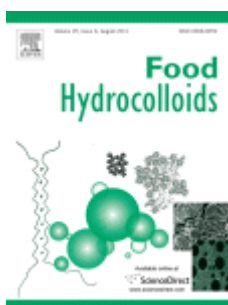
TANG, L.; CHEN, S.; SU, W.; WENG, W.; OSAKO, K.; TANAKA, M. Physicochemical properties and film forming ability of fish skin collagen extracted from different freshwater species. Process Biochemistry 50(1): 148-155, 2015.

TAKARINA N. D.; INDAH A. B.; NASRUL A. A.; NURMARINA A.; SAEFUMILLAH A.; FANANI A. A.; LOKA K. D. P. Optimisation of deacetylation process for chitosan production from red snapper (*Lutjanus* sp.) scale wastes. Journal of Physics: Conference Series. Volume 812, Number 1, 2017.

TOLDRÁ, F.; ARISTOY, M.; MORA, L.; REIG, M. Innovations in value-addition of edible meat by-products. Meat Science. 92 (3): 290-296, 2012.

APÊNDICE A - ARTIGO CIENTÍFICO

Extração e caracterização de colágeno da pele de pirarucu (*Arapaima gigas*).



**A ser submetido no periódico
FOOD HYDROCOLLOIDS
(ISSN: 0268-005X)**

Extração e caracterização de colágeno da pele de pirarucu (*Arapaima gigas*).

Klaramelia Consuelo Ramón Carpio^a; Antônio José Inhamuns da Silva^a; Ranilson de Souza Bezerra^b

Laboratório de Tecnologia do Pescado (LABTEC), Departamento de Ciências Pesqueiras, Universidade Federal do Amazonas, Campus Universitário, 69077-000, Manaus-AM, Brazil.

^a Laboratório de Tecnologia do Pescado, Departamento de Ciências Pesqueiras, Universidade Federal do Amazonas, Brazil.

^b Laboratório de Enzimologia (LABENZ), Departamento de Bioquímica – CCB, 12 Universidade Federal de Pernambuco, Brazil.

Autor para correspondência:

Antônio José Inhamuns da Silva

Laboratório de Tecnologia do Pescado, Departamento de Ciências Pesqueiras, Universidade Federal do Amazonas, Campus Universitário, 69077-000, Manaus-AM, Brazil.

.

Tel, +55 92 36474049; Fax, +55 92 36474042

email: asilva@ufam.edu.br

Resumo

O aproveitamento integral dos recursos pesqueiros tem produzido muitas pesquisas sobre os aspectos tecnológicos e nutricionais incentivando o crescimento industrial. Responsáveis pelo aumento do ônus ambiental mas ricos em colágeno e outras biomoléculas, os resíduos do processamento do pescado tornam-se subprodutos de maior valor comercial. Por tais motivos a presente pesquisa contemplou o aproveitamento de aqueles resíduos e ou subprodutos para extrair colágeno, nesse caso, da pele do pirarucu (*Arapaima gigas*) que é uma espécie emblemática da Bacia Amazônica, e em vez de descartar eles, esses resíduos tornou-se atrativo para o seu estudo e viabilização na extração de biomoléculas, especialmente o colágeno, tendo em vista a sua ampla aplicabilidade científica e biotecnológica. O processo de extração contou de duas etapas principais, a primeira de pré tratamento da pele com uma solução NaOH 0,05M, álcool butílico 10% e a segunda que é de extração do colágeno com uma solução de ácido acético 0,5M. Todo o processo foi realizada a 20°C. Após ter realizado o processo de extração foram realizadas as análises de caracterização do colágeno. O rendimento obtido foi de 27,8% e por meio do SDS PAGE (Eletroforese em gel de poliacrilamina - Dodecil sulfato de sódio) foi determinado que o colágeno obtido é do tipo I. Esse colágeno mostrou maior solubilidade relativa em pH 3 e diminuição da solubilidade a partir do 3% de concentração de NaCl. A temperatura de desnaturação do colágeno foi de 38,1°C e sua estrutura molecular permaneceu intata durante todo o processo de extração o qual foi visualizada mediante a técnica do FTIR (espectrofotometria de infravermelho com transformada de Fourier), apresentando um rádio de absorção de aproximadamente 1. Os resultados obtidos mostraram que é possível obter colágeno a 20°C a partir da pele de pirarucu, o colágeno obtido apresenta as características típicas do colágeno tipo I comercial e o procedimento utilizado sugere ser uma alternativa interessante para a extração do colágeno da pele do pirarucu pois com esse procedimento de extração utilizado o colágeno obtido manteve a sua estrutura molecular da tripla hélice estável; dando a conhecer à sociedade que o aproveitamento integral e sustentável dos recursos pesqueiros, nesse caso do pirarucu, é uma alternativa para o crescimento industrial e diminuição de poluição ambiental gerando novos produtos a partir de resíduos obtidos do processamento do pescado.

Palavras – chave: *Arapaima gigas*, pirarucu, colágeno, resíduos .

1. Introdução

O colágeno pertence a uma família de proteínas fibrosas encontradas em todos os animais multicelulares, amplamente distribuídas em aproximadamente todos os órgãos de vertebrados, sendo o elemento estrutural maior de peles, ossos, tendões, cartilagens, vasos sanguíneos, dentes e córnea, constituindo uma quantidade próxima entre 25% (Ogawa et al., 2004) e 30% do conteúdo total de proteína (Jongjareonrak et al., 2005a) providenciando suporte mecânico, resistência, elasticidade a vários órgãos e tecidos (peles, tendões, artérias e ossos) sendo disponíveis, biodegradáveis e biocompatíveis, estimulando o crescimento celular (Skopinska-Wisniewska et al., 2016).

Tem sido demonstrado que existe variação no colágeno quanto à sua composição de aminoácidos glicina, prolina e hidroxiprolina que são considerados os aminoácidos mais importantes no colágeno (50% do conteúdo total de proteína) (Hashim et al., 2015); especialmente a prolina e hidroxiprolina desempenham um papel importante na estabilização térmica da hélice do colágeno e a sequência desses aminoácidos mais importantes, são um dos principais fatores que afetam a termo estabilidade do colágeno (Gómez-Guillén et al., 2011).

Por ser o principal componente do tecido conjuntivo, sua importância para ser consumida também está relacionada para evitar os distúrbios metabólicos e genéticos que se apresentam pela sua falta e anormalidade no ser humano, tais como o escorbuto, a osteogênese imperfeita e a síndrome de Ehlers-Danlos (Baynes e Dominiczak., 2015); além do risco de transmissão de doenças conhecidas como zoonosis (Kittiphattanabawon et al., 2005), restrições religiosas, estilo de vida (Wu et al., 2012) e a disponibilidade as quais levam a buscar fontes alternativas dessa proteína, neste caso, a partir de organismos aquáticos como uma alternativa atraente (Sadowska et al., 2003).

O colágeno é considerado um dos biomateriais mais usados na ampla gama de aplicações industriais (Lafarga e Hayes, 2014) e os procedimentos usados nos últimos anos para extrair essa proteína a partir de organismos aquáticos, basearam-se na maioria deles, em parâmetros estabelecidos por diferentes autores segundo os seus critérios de avaliação de origem da matéria prima como por exemplo: habitat, sexo, peso, espécie, etc. (Liu et al., 2015) assim como também os custos e tempo do processo de extração levando a uma variação das condições de extração ótimas para se obter um rendimento desejável, pureza e integridade do colágeno com benefício na aplicação prática. Consequentemente, a escolha das condições ótimas para obter o colágeno a partir de organismos aquáticos, estão se definindo em base à estabilidade térmica da biomolécula devida ao conteúdo de aminoácidos glicina-prolina-hidroxiprolina que se mostraram distintas tanto para espécies de climas temperados quanto de climas tropicais, e também

quanto à similaridade da quantidade dos aminoácidos presentes na pele do peixe e na pele humana (Duan et al., 2009; Szpak, 2011), podendo ser uma alternativa ótima de uso do colágeno em forma de filmes para o tratamento de feridas (Albanna e Holmes IV, 2016) ou em diferentes indústrias.

A produção de diferentes espécies de peixes tem gerado durante décadas uma enorme quantidade de resíduos e/ou subprodutos provocando perdas econômicas e contaminação do ambiente os quais são responsáveis por 50-70g/100g do peso total deles (Kittiphattanabawon et al., 2005) mas dependendo da cultura e país esses resíduos podem ser considerados como resíduos ou iguarias com elevado preço (Toldrá et al., 2012); no entanto, a maioria desses subprodutos não são adequados para consumo humano (Jayathilakan et al., 2012). Por ser o pescado um alimento rico em proteínas (FAO, 2016) os resíduos gerados após o beneficiamento tem levado muitos pesquisadores a aproveitar esses resíduos para a geração de biomoléculas, tais como o colágeno, considerado um dos biomateriais mais usados na ampla gama de aplicações industriais (Lafarga e Hayes, 2014) (Mahboob, 2015; Kittiphattanabawon et al., 2015; Kaewdang et al., 2014; Li et al., 2013; Nagai et al., 2002; Kimura et al., 1987), e as extrações de quitina e quitosana (Takarina et al., 2017; Zaku et al., 2011), gelatina (Gómez-Guillén et al., 2009), tripsina (Costa et al., 2013; Costa et al., 2014) entre outros, aumentando o interesse desses resíduos como fonte de biomoléculas.

Por tais motivos com o fim de reduzir ou até eliminar os resíduos descartados do beneficiamento do pirarucu (*Arapaima gigas*) de aproximadamente 30% entre cabeça, peles, escamas e vísceras (Oliveira, 2007), o objetivo do trabalho foi extrair e caracterizar colágeno da pele de pirarucu mostrando as condições da sua extração e as características da biomolécula que a tornam disponível para a ampla gama de aplicações nas diferentes indústrias, pois tem sido mostrado que obter esta biomolécula a partir dos resíduos de recursos pesqueiros estaríamos contribuindo com a diminuição da poluição ambiental assim como gerando capital econômico (Bezerra et al., 2005).

2. Material e métodos

2.1 Material

Colageno tipo I de pele de bezerro foi adquirido da companhia Sigma Química (St. Louis, MO, USA) e marcadores de elevado peso molecular (GE Healthcare UK Limited, 132 Buckinghamshire, UK) para a estimação do peso molecular das proteínas. Todos os reagentes químicos usados foram de grau analítico.

2.2 Coleta e preparação da pele

A pele de pirarucu, oriundo de sistema de manejo, foi obtida do frigorífico Kardume Comércio de Pescado Ltda (Manaus/AM, Brasil) já congelada para ser transportada ao Laboratório de Tecnologia do Pescado da Universidade Federal do Amazonas (UFAM). Essa pele foi lavada com água destilada gelada, e realizaram-se cortes de aproximadamente $1,0 \text{ cm}^2$, que foram armazenados em freezer à -20°C até sua utilização.

2.3 Composição centesimal

Porções de peles foram removidas para as análises de composição centesimal de acordo com a Associação de Químicos Analíticos Oficiais (A.O.A.C., 2000) em triplicata.

2.4 Processo de extração do ASC da pele do peixe

O processo foi realizado segundo a metodologia usada por Liu et al. (2015) com algumas modificações. A temperatura de trabalho foi de 20°C com homogenização constante em um banho ultratermostático com circulação de água da marca QUIMIS modelo Q214M, acoplado a um agitador mecânico. Os enxagues foram realizadas com água destilada gelada e a centrifugação e armazenagem foram realizadas a 4°C .

2.4.1 Pré -Tratamentos

Realizaram-se em etapas. A primeira etapa alcalina, com a finalidade de eliminar as proteínas não colagenosas, foi realizada usando uma solução de NaOH 0,05M, durante 12 h, com trocas de solução a cada 6 h em uma proporção de 1:20 (p/v); para continuar a seguinte etapa enxaguaram-se as amostras com água destilada gelada até que estas apresentaram pH neutro. A segunda etapa, de desgorduramento das amostras, foi realizada com uma solução de álcool butílico 10% em uma proporção de 1:20 (v/v) durante 24 h, com trocas de solução a cada 12 h e posterior enxague com água destilada gelada, ficando as peles prontas para a extração do colágeno.

2.4.2 Extração do colágeno da pele

Essa etapa foi realizada usando solução de ácido acético em uma concentração de 0,5M na proporção de 1:40 (p/v), durante 72h e com trocas cada 24h. Foi realizado o tamponamento com Buffer Carbonato-Bicarbonato Cloreto de Sódio 0,9M até obter um pH de 8,87 na solução viscosa obtida. A seguir, realizou-se a centrifugação a 4°C , a uma velocidade de 11,000 rpm durante 40 minutos. O material coletado da centrifugação, foi submetido a três diálises; a primeira em uma solução de ácido acético 0,1 M e as duas últimas em água destilada até obter pH neutro

da amostra. Cada diálise foi realizada durante 12h. O material dialisado foi congelado para ser liofilizado obtendo o colágeno solúvel ácido (ASC).

2.4.3. Rendimento

O rendimento do material liofilizado, foi calculado em base ao peso seco, segundo a fórmula:

$$\text{Rendimento (\%)} = (M/M_0) \times 100$$
, onde M é o peso seco (g) do material liofilizado e, M_0 é o peso da pele seca usada (g)

2.5 Caracterização do Colágeno solúvel ácido (ASC)

2.5.1. Eletroforese em gel de poliacrilamina (SDS-PAGE)

Para poder ter a certeza que o material liofilizado é colágeno tipo I, realizou-se o SDS-PAGE de acordo ao método de Laemmli (1970). Usou-se gel na concentração de 4 % (p/v) e gel de separação a 12,5 %. A amostra do material liofilizado foi dissolvido em 1% (p/v) de SDS chegando a uma concentração de 2 mg/mL e adicionou-se em igual volume o tampão amostra (0,5 M Tris-HCl, pH 6,8 contendo SDS 4 % (p/v), glicerol 20 % (v/v)) com 10 % (v/v) beta-mercaptoetanol; em uma proporção de 1:4 (v/v). A seguir, 25 µL das amostras foram aquecidas a 100°C por 10 minutos em um banho (IKA® Works 144 Inc., China) e colocadas no gel de poliacrilamida e submetidas ao sistema de eletroforese (15 mA/ gel) vertical (Vertical Electrophoresis System Bio-Rad 143 Laboratories, Inc.). Então, o gel foi corado com Azul de Coomassie 0,05% (p/v) em 15% de metanol (v/v) e 5% (v/v) de ácido acético durante 10 minutos e descorado com uma solução de 30% (v/v) de metanol e 10% (v/v) de ácido acético durante 12h. O colágeno bovino tipo I (Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO) foi preparado seguindo o procedimento similar das amostras e 10 µl dele foi usado como colágeno padrão. Marcadores de alto peso molecular (GE Healthcare UK Limited, Buckinghamshire, UK) foram usados para estimar o peso molecular das proteínas.

2.6 Espectrofotometria de Infravermelho com transformada de Fourier – FTIR

Foi aplicada à amostra liofilizada ASC utilizando espectrofotômetro FTIR (Cary 630 Agilent Technologies). Os sinais foram automaticamente coletados em uma faixa de 4000 – 400 cm^{-1} a uma resolução de 2 cm^{-1} comparados com um espectro de fundo coletado da célula vazia limpa.

2.7 Solubilidade dos colágenos obtidos em diferentes valores e concentrações de pH e NaCl

A solubilidade do colágeno foi realizada pelo método de Montero, Jiménez-Colmenero e Borderias (1991) com algumas modificações. As amostras ASC em uma concentração final de 3 mg/ml, foram dissolvidas em solução de ácido acético 0,5 M, das quais 8 ml da solução do colágeno amostra foi colocada em tubo de centrifugação em pH ajustado de 1,0 – 12,0 com solução de NaOH 6M e uma solução de HCL 6M. Essas soluções foram homogeneizadas durante 24h e posteriormente centrifugadas a 11,000 rpm por 1h à 4 °C. Os sobrenadantes obtidos e coletados foram submetidos à medição da concentração de proteínas pelo método de Bradford (1976), usando como padrão o soro de albumina bovina (BSA). O pH que apresentou maior solubilidade foi considerado como a solubilidade relativa.

A solubilidade em diferentes concentrações de NaCl foi realizada usando 5mL da solução de colágeno com uma concentração final de 6 mg/mL e mais 5mL de 0%, 2%, 4%, 6%, 8%, 10% e 12% (p/v) de uma solução de ácido acético 0,5M com NaCl obtendo concentrações finais de 0%, 1%, 2%, 3%, 4%, 5% e 6% (p/v) de NaCl. Essas soluções foram homogeneizadas durante 60 minutos e posteriormente centrifugadas a 11,000 rpm por 60 minutos à 4 °C. A concentração de proteínas foi medida pelo mesmo método usado para a solubilidade em pH e a concentração de NaCl que apresentou maior solubilidade foi considerada como a solubilidade relativa.

2.8 Determinação da temperatura de desnaturação

A temperatura de desnaturação (Td) foi determinada segundo a metodologia de Zhu e Kimura (1991), com algumas modificações. Foi utilizado um viscosímetro (Brookfield. Modelo DV-II) em cujo recipiente foi adicionada uma solução de 6mL de colágeno em uma concentração de 1mg/mL. As amostras foram aquecidas de 20 °C até 60 °C em uma faixa de 1 °C/min. A temperatura de desnaturação foi determinada pela viscosidade fracionada em 0,5 sendo considerada como a temperatura de desnaturação (Muyonga et al., 2004). A viscosidade fracionada foi determinada mediante a fórmula:

$$\text{Viscosidade fracionada} = [(\epsilon_2/C) - (\epsilon_3/C)] / [(\epsilon_1/C) - (\epsilon_3/C)]$$

Onde, C= concentração de colágeno(mg/ml), ϵ_1 =viscosidade na temperatura mínima, ϵ_2 =viscosidade à temperatura medida e, ϵ_3 = viscosidade à temperatura máxima

2.9 Análises estatísticas

As análises físico-químicas foram realizadas em triplicata e expressas em média $\pm$ desvio padrão.

3. Resultados e discussão

3.1 Composição centesimal

Os valores obtidos de proteínas, umidade e lipídeos da pele do pirarucu (Tabela 1) apresentaram uma variação considerável em comparação com os dados obtidos da pele da tilápia realizada por Alfaro et al. (2013). O valor médio do teor proteico encontrada na pele de pirarucu foi superior ao obtido na pele da tilápia (21,30%) (Muyonga et al., 2004; Alfaro et al., 2013) o qual mostra que é uma fonte potencial de colágeno; quanto ao conteúdo de umidade foi inferior ao encontrado na pele de tilápia (72,6%) o que faz supor que o método de congelamento utilizado para conservar a pele de pirarucu no frigorífico pode ter afetado as estruturas proteicas ocasionando perda de umidade durante o descongelamento (FAO, 1999).

Tabela 1: Valores médios (%) da composição centesimal da pele de pirarucu *in natura*.

Região da pele	Umidade	Cinza	Lipídeos	Proteína	Carboidratos
Ventre	59,55±0,26	0,20±0,01	17,72±0,19	21,92±0,71	0,61
Lombo	53,64±0,67	0,16±0,01	21,03±0,73	22,20±1,17	2,97
Cauda	47,64±0,26	0,20±0,02	19,27±0,66	31,43±2,73	1,46
Média	53,61	0,18	19,34	25,18	1,68

Também foi observado um alto conteúdo de lipídeos (19,34%) em comparação ao reportado por Alfaro et al. (2013) com valores de 3,85% para a pele da tilápia; isso pode ser devido à forma como foi retirada a pele do peixe sendo um ito importante essa etapa para que nas etapas posteriores os lipídeos não possam interferir na penetração das soluções e no tempo de contato com a pele durante o processo de extração do colágeno. Outro fator importante a mencionar é que esse conteúdo de lipídeos pode ser devido ao tamanho da espécie (*Arapaima gigas*) utilizada para extrair o colágeno, porque foi observado que o conteúdo de lipídeos, dentre outros fatores, varia com o tamanho do indivíduo (FAO, 1999). Também sabe-se que o cheiro peculiar que apresentam as peles de peixe está associado ao teor de lipídeos e devido à presença de componentes nitrogenados e ao conteúdo elevado de ácidos graxos insaturados (Grossman; Bergman, 1992).

3.2 Rendimento do colágeno

Neste este trabalho a extração do colágeno a partir de uma espécie tropical e emblemática da Bacia Amazônica, o *Arapaima gigas*, foi realizada a 20 °C com base que as espécies de águas tropicais possuem maior temperatura de desnaturação do colágeno em comparação com aquelas de águas temperadas (Takahashi e Yokoyama, 1954). O presente trabalho mostrou que é possível obter colágeno ácido solúvel (ASC) da pele de *Arapaima gigas* nas condições de extração utilizadas com um rendimento de 27,74%.

As condições de extração utilizadas sugerem ser uma alternativa para obter colágeno da pele do pirarucu, afirmando o sugerido por Liu et al. (2015) para *Ctenopharyngodon idella* (carpa capim) outra espécie de águas tropicais, o qual nesse caso teve um bom rendimento de colágeno utilizando a mesma combinação, temperatura e concentração de soluções, permanecendo assim a estrutura integral do colágeno. O fato de não ter obtido um maior rendimento pode ser devido às moléculas de colágeno que permaneceram unidas através de ligações covalentes cruzadas sendo as responsáveis pela insolubilidade da proteína no ácido acético (Foegeding et al., 1996) sendo causada pelos parâmetros operacionais utilizados durante o processo de extração do colágeno para a pele de pirarucu, pois o rendimento obtido para cada tipo de espécie pode estar determinado pelo tempo, temperatura e concentrações das soluções utilizadas para o processo de extração, o qual é percebido no rendimento final da extração (Liu et al., 2015).

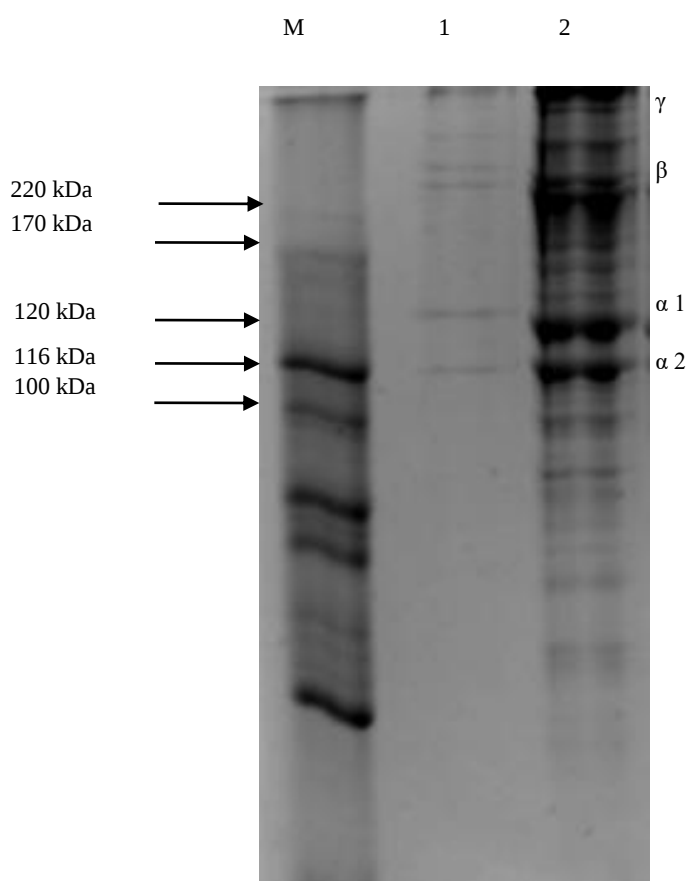
Foram encontradas nas peles de outras espécies valores de rendimento de colágeno similares e diferentes ao encontrado no pirarucu, com valores de 22% para *Oreochromis niloticus* (Sujithra et al., 2013), 41,3% para *Cyprinus carpio* (Duan et al., 2009), 51,4% para *Lateolabrax japonicus* (Nagai e Suzuki, 2000) e 50 – 60 % para *Odonus niger* (Muralidharan et al., 2013).

3.3. Eletroforese em gel de poliacrilamida

Vários autores tem reportado o colágeno nativo como um heteropolímero com peso molecular de aproximadamente 300 kDa, apresentando duas bandas proteicas claramente diferenciadas e próximas entre si (Sugiyama et al., 1989). Na Figura 1 mostra-se o padrão eletroforético do marcador de elevado peso molecular (M), do colágeno tipo I padrão bovino comercial (1) e do ASC (2) da pele de *Arapaima gigas*. A amostra apresentou duas cadeias α em posições próximas (α_1 e α_2) as quais têm uma massa molecular entre 100 e 120 kDa e, as subunidades β e γ com uma massa molecular acima de 200 kDa, podendo ser observado um padrão similar entre as

bandas do ASC da amostra (2) e o colágeno padrão bovino tipo I (1), características de colágeno tipo I, reportado por Badii e Howell (2003).

Figura 1. Eletroforese em gel de policrilamida. M: Marcador de elevado peso molecular; 1: colágeno tipo I padrão bovino comercial; 2: ASC da pele de *Arapaima gigas*.



3.4. Espectrofotometria de Infravermelho com transformada de Fourier – FTIR

A precisão da técnica FTIR para analisar a estrutura química das amostras ajudou detectar as vibrações dos grupos funcionais presentes, cujas ligações e grupos de ligações tendem a vibrar nas frequências características no momento de absorver uma radiação infravermelha em um número de onda específico (cm^{-1}) (Haris – Severcan, 1999) representando esses espectros a assinatura molecular da amostra (Vidal e Mello, 2011) podendo conferir assim a sua integridade e pureza o qual foi preservada durante sua extração.

Os picos de absorção a 3307cm^{-1} e 3077cm^{-1} são características típicas das bandas de amida A e amida B (Doyle et al., 1975) podendo ser observada a amida A na amostra ASC em 3307cm^{-1} mostrando sua associação com as vibrações de estiramento N-H com existência de bandas de hidro-

gênio (Doyle et al., 1975). As bandas amida A são bastantes parecidas com o colágeno padrão bovino reportado por Kittiphattanabawon et al. (2015) com um valor de 3296 cm^{-1} . Segundo Doyle et al., (1975) essas vibrações de estiramento N-H livre acontecem usualmente na faixa de 3400 a 3440 cm^{-1} mas quando o grupo NH dos peptídeos está envolvido nas bandas hidrogenadas, a posição se traslada em menores frequências, ao redor de 3300 cm^{-1} (Tabela 2 e Fig 2); a partir desse enunciado, pode-se indicar que muitos dos grupos NH do colágeno ASC foram envolvidos nas ligações hidrogênio. As bandas de amido B do colágeno foram observadas em 2953 cm^{-1} o que está relacionado com o reportado pelo estiramento assimétrico do CH_2 (Muyonga et al., 2004; Kittiphattanabawon et al., 2015) e com valores parecidos ao reportado por Kittiphattanabawon et al. (2015) para o colágeno padrão bovino, com um valor de 2933 cm^{-1} . As diferenças nos números de onda e amplitude das amidas A e B do ASC comparadas com o colágeno padrão bovino reportado por Kittiphattanabawon et al. (2015), indicam que a estrutura secundária de ambos colágenos pode ser diferente em algumas extensões. As bandas de amida I são frequentes na faixa de 1750 a 1600 cm^{-1} e associadas principalmente às vibrações de estiramento do grupo carbonila (bandas C=O) ao longo da cadeia polipeptídica (Payne e Veis, 1988) sendo marcador sensível da estrutura secundária peptídica (Surewicz e Mantsch, 1988) que ao mesmo tempo sua estrutura múltipla que apresenta é devido à heterogeneidade dos seus grupos peptídeos C=O na tripla hélice influenciando no perfil espectral da banda de Amido I (Lazarev et al., 1985). Para o ASC obtido a banda amida I foi observada a 1704 cm^{-1} ficando por dentro do reportado por Payne e Veis (1988). As bandas Amido II e III na faixa de 1621 e 1321 cm^{-1} respectivamente, são resultado das vibrações das ligações N-H e estiramentos C-H, respectivamente (Payne e Veis, 1988).

Figura 2. Análises de FTIR do ASC a partir da pele de *Arapaima gigas*

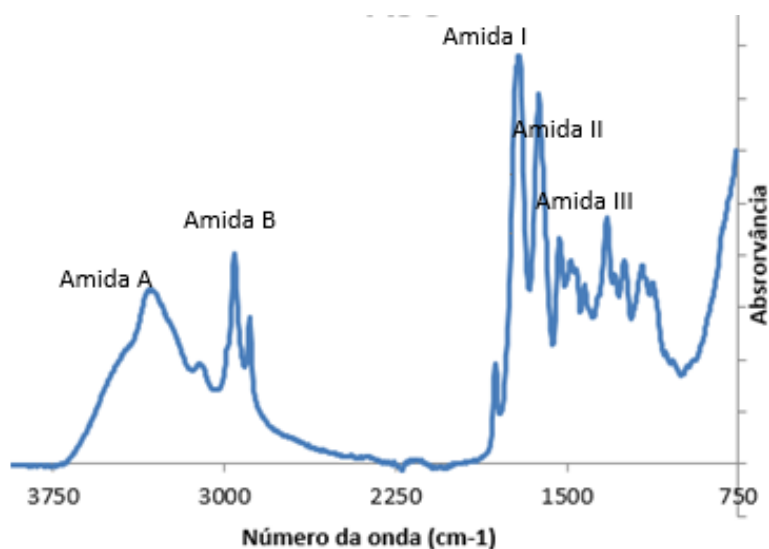


Tabela 2: Locação dos principais picos espectrais do colágeno obtido a partir da pele de *Arapaima gigas*.

^a Pele de <i>Arapaima gigas</i>	Região
3307	Amida A. Vibrações de estiramento N-H com de bandas de hidrogênio
2953	Amida B. Vibração de estiramento N-H
1704	Amida I. Vibração, estiramento da carbonila C=O
1621	Amida II. Vibração em carbonilas C=O, ligações N-H
1321	Amida III. Vibração de estiramentos C-H

^a Pico do número de onda (cm^{-1}).

Segundo Jackson e Mantsch (1995) picos de absorção próximos a 1633 cm^{-1} não é porque o colágeno sofreu desnaturação, senão que na faixa de $1850\text{-}1628 \text{ cm}^{-1}$ é considerada uma região característica na absorção de carbonilas de ligação dupla carbono-oxigênio dando um pico forte dentro dessa faixa devido à concentração da hidroxiprolina (Silverstein et al., 1979; Lazarev et al., 1985) o qual pode ser percebido na Figura 2. A presença das pontes de hidrogênio formadas pelas moléculas de água e as moléculas do colágeno, são causantes de modificações nos espectros de FITR (Susi et al., 1971) e exemplo disso é a intensidade do pico amida B (estiramentos NH) apresentando mudanças mais pronunciadas na região amida II (1621 cm^{-1}).

A estabilidade da estrutura da tripla hélice do colágeno foi determinada mediante o cálculo do rádio de absorção entre o Amida III e 1454 cm^{-1} ; sendo o valor obtido próximo a 1 (Liu et al., 2015) o qual significa que a estrutura molecular do ASC da pele de pirarucu permaneceu estável.

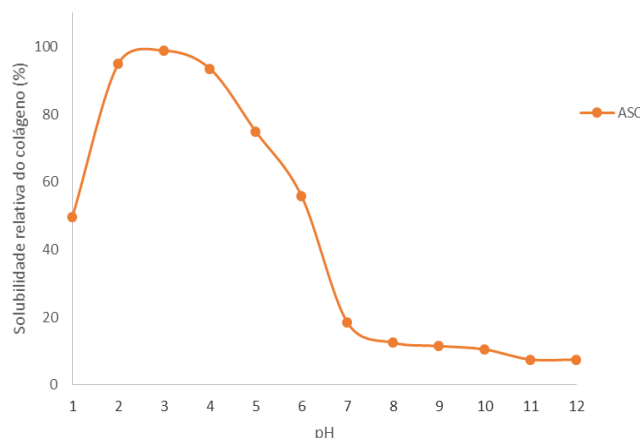
3.5 Solubilidade dos colágenos em diferentes valores e concentrações de pH e NaCl

O comportamento do colágeno e o efeito de diferentes valores de pH e concentrações de NaCl, estão mostrados nas Figuras 3 e 4, respectivamente. Quanto à solubilidade em pH o ASC do presente estudo mostrou uma maior solubilidade em valores de pH próximos a 2 até 4 com uma máxima no pH 3, pois geralmente os colágenos são mais solúveis em valores ácidos de pH (Foege-ding et al., 1996) e, uma menor (próximo ao 50%) abaixo de pH 2 e a partir do pH 7, mostrando que em valores inferiores ou superiores ao seu ponto isoelétrico (PI) a carga neta das moléculas da proteína aumenta e consequentemente sua solubilidade aumenta pela força repulsiva entre as cadeias resultantes no incremento de solubilidade das proteínas (Vojdani, 1996).

Essa diminuição de solubilidade deve-se que o colágeno atingiu o seu ponto isoelétrico ou seja nesse valor de pH a solubilidade da proteína é quase nula, e tudo isso mostrou como a solubilidade do ASC do *Arapaima gigas* diminuiu drasticamente entre valores de pH 7-10 o qual mostra

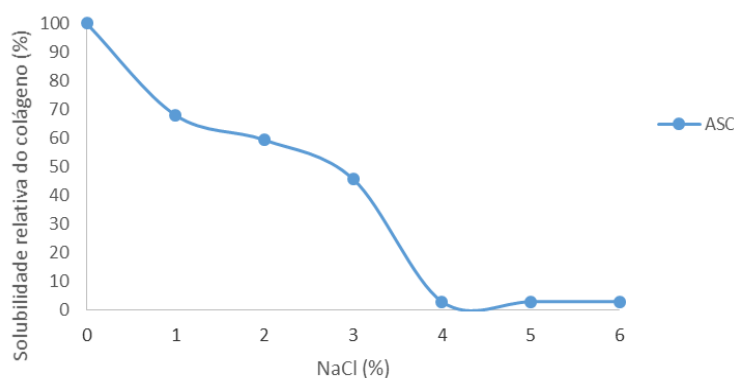
que a proteína foi precipitada nessa faixa de pH tornando-a não solúvel (Foegeding et al., 1996; Jongjareonrak et al., 2005a).

Figura 3. Solubilidade relativa do colágeno ASC do *Arapaima gigas* em diferentes valores de pH.



Na Figura 4 observa-se o efeito de diferentes concentrações de NaCl na solubilidade do ASC obtido. Inicialmente constata-se que a solubilidade dos colágenos começa a precipitar-se uma vez que se aumenta a porcentagem de sal. O decréscimo a partir do 1% de NaCl é algo drástico. Quando a concentração de NaCl atinge o 3% o ASC apresenta uma perda de solubilidade de 45,68% e próximos de 4% de NaCl a perde quase toda. Essa diminuição da solubilidade do colágeno é evidenciado conforme exista o aumento dos valores de sais (Asghar e Henrickson, 1982) mostrando que o colágeno não é muito tolerável ao sal perdendo mais de 50% da solubilidade a partir de concentrações de 3% de NaCl, atingindo a sua menor solubilidade a partir de 4% de NaCl. Esse resultado afirma o reportado por Vojdani (1996) explicando que o aumento nas forças iônicas causa uma redução na solubilidade da proteína devido as interações hidrofóbicas entre as cadeias proteicas, incrementando assim competição de sais pela água com os íon de sais, levando à precipitação da proteína. Segundo a fonte de obtenção do colágeno as propriedades moleculares do colágeno pode variar; por exemplo, colágenos ASC são mais susceptíveis a uma rápida perda de solubilidade em maiores concentrações de NaCl, diferentes dos colágenos PSC os quais devido à pepsina, são os que promovem a hidrólise nas zonas de maior entrecruzamentos entre as moléculas de alto peso molecular (Singh et al., 2011).

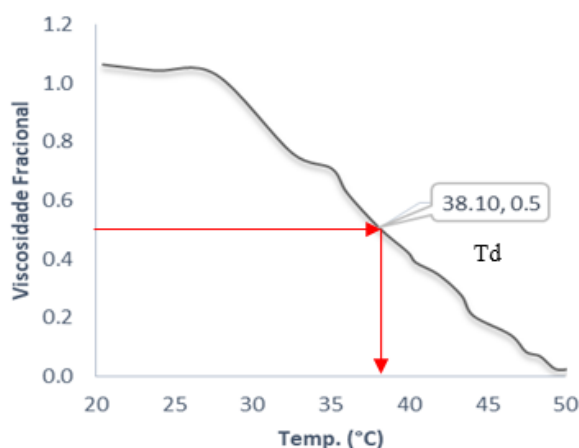
Figura 4. Solubilidade relativa do colágeno ASC do *Arapaima gigas* a diferentes concentrações de NaCl.



3.6 Temperatura de desnaturação

A temperatura de desnaturação (T_d) foi considerada aquela onde a viscosidade fracional foi 0,5. A figura 5 apresenta a temperatura de desnaturação do ASC obtido no presente trabalho, sendo 38,1 °C a temperatura de desnaturação.

Figura 5. Temperatura de desnaturação do ASC de *Arapaima gigas*.



Sabe-se que a estabilidade térmica do colágeno está relacionada ao hábitat e temperatura do corpo (Rigby, 1968) da mesma forma a temperatura de desnaturação (T_d) de uma mesma espécie pode ser apresentada com pequenas variações devido ao método utilizado para medir essa T_d (Tan-Chang, 2018). Portanto a T_d do colágeno de peixes de águas temperadas será sempre menor que os peixes de águas tropicais (Takahashi e Yokoyama, 1954). Desde anos anteriores autores como Wong (1989) afirmam que a aplicação de elevadas temperaturas de aquecimento no colágeno causa a quebra das pontes de hidrogênio e ligações intermoleculares e como resultado, a sua estrutura de

tripla hélice é mudada, hidrolisada, desnaturada, ou seja, torna-se gelatina. Essas mudanças são observadas na alteração das suas propriedades físicas, como a viscosidade (Shahiri et al., 2012) e isso foi observado no ASC de *Arapaima gigas*. Assim, a Td do colágeno está definida como a temperatura na qual a viscosidade é parcialmente alterada.

Valores de Td também foram encontradas em outras espécies comparadas com a Td do colágeno porcino (37°C) (Nagai, 2000), com valores de 32°C para *Oreochromis niloticus* (Sujithra et al., 2013), 28°C para *Cyprinus carpio* (Duan et al., 2009), 24,6°C para *Theragra chalcogramma* (Yan et al., 2008), 25,6°C para (*Scomber japonicus*) (Nagai e Suzuki, 2000) e 28°C para *Odonus niger* (Muralidharan et al., 2013).

4. Conclusão

Foi possível obter colágeno a partir da pele de pirarucu em uma temperatura pouco comum de extração. A aplicação de 20°C em todo o processo de extração mostrou que é possível obter colágeno (ASC) a partir da pele de pirarucu com caracterizações físicas e químicas próprias do colágeno do tipo I. Com o ASC obtido da pele de pirarucu é preciso afirmar que todo o processo de extração utilizado torna-se uma boa alternativa para obter colágeno com uma estrutura molecular estável o qual pode ser aplicado em diferentes processos industriais em pequenas ou grandes escalas criando capital econômico e novos produtos a partir de subprodutos ou resíduos obtidos do processamento do pescado. Recomenda-se continuar na procura das condições ótimas de extração do colágeno de pirarucu com a finalidade de obter os maiores rendimentos possíveis mantendo uma estrutura molecular estável.

Agradecimentos

O presente estudo foi realizado com o apoio financeiro das agências brasileiras: Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Empresa Brasileira de Inovação e Pesquisa (FINEP) e Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia do estado de Pernambuco (FACEPE).

Referências

1. Albanna, M., Holmes, J. H. IV. (2016). Skin Tissue Engineering and Regenerative Medicine, 1st Edition. Medical Center Boulevard Winston-Salem, NC, USA. Academic Press is an imprint of Elsevier. ISBN:978-0-12-801654-1.
2. Alfaro, A., Fonseca, G., Prentice, C., Balbinot, E. (2013). Physical and chemical properties of wami tilapia skin gelatin. Food Science and Technology. Campinas, 33(3): 592-595
3. Asghar, A., Henrickson, R. L. (1982). Chemical, biochemical, functional and nutritional characteristics of collagen in food systems. In C. O. Chichester.
4. Associação de Químicos Analíticos Oficiais- AOAC. (2000). Official Methods of the Association of Official Agricultural Chemist's International. 17th ed. Gaithersburg: AOAC International.
5. Baynes, J. W., Dominiczak, M. H. (2015). Bioquímica Médica. Tradução da 4ª edição. Saunders Elsevier. capítulo 29.
6. Bezerra, R. S., Lins, E. J.F., Alencar, R. B., Paiva, P. M.G., Chaves, M. E.C., Coelho, L. C.B.B., Carvalho, L. B. (2005). Alkaline proteinase from intestine of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). Process Biochemistry, v. 40, p. 1829-1834.
7. Badii, F., Howell, N. K. (2003). Elucidation of the effect of formaldehyde and lipids on frozen stored cod collagen by FT-Raman spectroscopy and differential scanning calorimetry. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 51, 1440–1446.
8. Bradford, M.M. (1976). "A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Dye Binding." Analytical Biochemistry. 72, 248–254.
9. Bryan, M.A., Brauner, J.W., Anderie, G., Flach, C.R., Brodsky, B., Mendelsohn, R. (2007). FTIR studies of collagen model peptides: complementary experimental and simulation approaches to conformation and unfolding. J. Am. Chem. Soc. 129, 7877–7884.
10. Costa H.M.S., Freitas Júnior A.C.V., Amaral I.P.G., Hirata I.Y., Paiva P.M.G., Carvalho Jr. L.B., Oliveira V., Bezerra R.S. (2013). Metal-sensitive and thermostable trypsin from the crevalle jack (*Caranx hippos*) pyloric caeca: purification and characterization Chem. Cent. J., 7, pp. 166-173.
11. Costa, H.P.S., Oliveira, J.T.A., Sousa, D.O.B., Morais, J.K.S., Moreno, F.B., Monteiro-Moreira, A.C.O., Viegas, R.A. & Vasconcelos, I.M. (2014). JcTI-I: a novel trypsin inhibitor from

Jatropha curcas seed cake with potential for bacterial infection treatment. *Frontiers in Microbiology* 5: 1-12.

12. Doyle B.B., Bendit E.G., Blout E.R. (1975). Infrared spectroscopy of collagen and collagen-like polypeptides. *Biopoly* 14(5):937–957.
13. Duan, R., Zhang, J., Du, X., Yao, X., Konno, K. (2009). Properties of collagen E. M. Marata, & B. S. Schweigert (Eds.), *Advances in food research* (pp. 237e273). London: Academic Press..
14. FAO, (1999). *El Pescado Fresco: Su Calidad y Cambios de su Calidad*. Documento Técnico de Pesca 348. Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación. Editado por H.H. Huss Laboratorio Tecnológico Ministerio de Pesca Dinamarca.
15. Foegeding, E. A., Lanier, T. C., Hultin, H.O. (1996). Characteristics of edible muscle tissues. In: Fennema, O.R. (Ed.), *Food Chemistry*. Marcel Dekker, New York, pp. 879–942.
16. Gomez-Guillen M.C., Pérez-Mateos M., Gomez- Estaca J., Lopez-Caballero, E, Gimenez B.and. Montero P . (2009). Fish gelatin: a renewable material for developing active biodegradable films. *Trends in Food Science & Technology* .20. 3-16.
17. Gómez-Guillén, M. C., Giménez, B., López-Caballero, M. A. And Montero, M. P. (2011). Functional and bioactive properties of collagen and gelatin from alternative sources: A review. *Food Hydrocolloids* 25(8): 1813-1827.
18. GROSSMAN, S., BERGMAN, M. (1992). Process for the production of gelatin from fish skins. US Patent 5.093.474.
19. Haris, P.I., Severcan, F. (1999). FTIR spectroscopic characterization of protein structure in aqueous and non-aqueous media. *J. Mol. Catal. B Enzym.* 7, 207–221.
20. Hashim, P. , Mohd Ridzwan, M. S., Bakar, J., Mat Hashim, D. (2015). Collagen in food and beverage industries. *International Food Research Journal* 22(1): 1 – 8.
21. Jackson, M., Mantsch, H.H. (1995). The use and misuse of FTIR spectroscopy in the determination of protein structure. *CRC Crit. Rev. Biochem.Mol. Biol.* 30, 95-120.
22. Jayathilakan K., Sultana Khudsia, Radhakrishna K., and Bawa A. S. (2012). Utilization of by-products and waste materials from meat, poultry and fish processing industries: a review. *J Food Sci Technol.* Jun; 49(3): 278–293.

23. Jongjareonrak, A., Benjakul, S., Visessanguan, W., Tanaka, M. (2005a). Isolation and characterization of collagen from bigeye snapper (*Priacanthus marcracanthus*) skin. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, v. 85, p. 1203–1210.
24. Kaewdang O., Benjakul S. , Kaewmanee T. , Kishimura H. (2014). Characteristics of collagens from the swim bladders of yellowfin tuna (*Thunnus albacares*) *Food Chemistry* 155.264–270.
25. Kimura, S., Ohno, Y., Miyauchi, Y., Uchida, N. (1987). Fish skin type I collagen: Wide distribution of an $\alpha 3$ subunit in teleosts. *Comp Biochem Physiol* 88(B):27–34.
26. Kittiphattanabawon, P., Benjakul, S., Visessanguan, W., Nagai, T., Tanaka, M. (2005). Characterization of acid-soluble collagen from skin and bone of bigeye snapper (*Priacanthus tayenus*). *Food Chemistry*, v. 89, p. 363–372.
27. Kittiphattanabawon, P., Benjakul, S., Sinthusamran, S., Kishimura, H. (2015). Characteristics of collagen from the skin of clown featherback (*Chitala ornata*). *International Journal of Food Science and Technology* 50(9): 1972-1978.
28. Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, v. 227, p. 680–685.
29. Lafarga, T., Hayes, M. (2014). Bioactive peptides from meat muscle and by-products: generation, functionality and application as functional ingredients. *Meat Science* 98(2): 227-239.
30. Lazarev, Y.A., Grishkovsky, B.A., Khromova, T.B., (1985). Amide I band of IR spectrum and structure of collagen and related polypeptides. *Biopolymers* 24, 1449–1478.
31. Li, Z., Wang, B.M, Chi, C., Zhang, Q., Gong, Y., Tang, J., Luo, H., Ding, G. (2013). Isolation and characterization of acid soluble collagens and pepsin soluble collagens from the skin and bones of Spanish mackerel (*Scomberomorous niphonicus*). *Food Hydrocolloids*, v. 31, p. 103-113.
32. Liu, D., Zhang, X., Li, T., Yang, H., Zhang, H., Regenstein, J. O. E. M.; Zhou, Peng. (2015). Extraction and characterization of acid- and pepsin-soluble collagens from the scales, skins and swim-bladders of grass carp (*Ctenopharyngodon idella*). *Food Bioscience*, v. 9, p. 68-74.
33. Mahboob, S. Isolation and characterization of collagen from fish waste material- skin, scales and fins of *Catla catla* and *Cirrhinus mrigala*. *Journal of Food Science and Technology- Mysore*. 52(2): 4296-4305, 2015

34. Montero, P., Jimenez-Colmenero, F., Borderias, J. (1991). Effect of pH and the presence of NaCl on some hydration properties of collagenous material from trout (*Salmo irideus* Gibb) muscle and skin. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, v. 54, p. 137–401 146.
35. Muralidharan, N., Shakila R., Sukumar D., Jeyasekaran G. (2013). Skin, bone and muscle collagen extraction from the trash fish, leather jacket (*Odonus niger*) and their characterization. *Journal Food Sciencie and Technology*. 50(6):1106–1113.
36. Muyonga, J.H., Cole, C.G.B., Duodu, K.G. (2004). Characterisation of acid soluble collagen from 403 skins of young and adult Nile perch (*Lates niloticus*). *Food Chemistry*, v. 85, p. 81-89, 404.
37. Nagai T., Suzuki N. (2000). Isolation of collagen from fish waste material — skin, bone and fins. *Food Chemistry*. Volume 68, 3,277-281.
38. Nagai, T., Araki, Y., Suzuki, N. (2002). Collagen of the Skin of Ocellate Puffer Fish (*Takifugu rubripes*),” *Food Chemistry*, Vol. 78, No. 2, pp. 173-177.
39. Ogawa, et al. (2004). Biochemical properties of bone and scale collagens isolated from the sub-tropical fish black drum (*Pogonia cromis*) and sheepshead seabream (*Archosargus probatocephalus*). *Food Chemistry*, v. 88, p. 495-501.
40. Oliveira, P. R. 2007. Qualidade do Pirarucu (*Arapaima gigas*, Shinz 1822) procedente de piscicultura, estocado em gelo, congelado e de sus produtos derivados. Tese de Doutorado, Instituto Nacional de Pesquisa do Amazonas/Universidade Federal do Amazonas, Manaus, Amazonas. 130p.
41. Payne KJ, Veis A. (1988). Fourier transform IR spectroscopy of collagen and gelatin solutions: deconvolution of the amide I band for conformational studies. *Biopoly* 27(11):1749–1760.
42. Rigby, BJ. (1968). Amino-acid composition and thermal stability of the skin collagen of the Antarctic ice-fish. *Nature* 219:166–167.
43. Sadowska, M., Kolodziejska, I., Niecikowska, C. (2003). Isolation of collagen from the skin of Baltic cod (*Gadus morhua*). *Food Chemistry*., 81: 257-262.
44. Shahiri, T.H., Maghsoudlou, Y., Motamedzadegan, A., Sadeghi, M.A.R., & Rostamzad, H. (2012). Study on some properties of acid-soluble collagens isolated from fish skin and bones of rainbow trout (*Onchorhynchus mykiss*). *International Food Research Journal*, 19(1), 251–257.

45. Singh P, Soottawat B, Sajid M, Hideki K (2011). Isolation and characterisation of collagen extracted from the skin of striped catfish (*Pangasianodon hypophthalmus*). Food Chem 124:97–105.
46. Silverstein, R.M., Bassler, G.C., Morrill, T.C. (1979). Identificação espectroscópica de compostos orgânicos. Ed. Guanabara Koogan S.A.
47. Skopinska-Wisniewska, J., Wegrzynowska-Drzymalska, K., Bajek, A., Maj, M., Sionkowska, A. (2016). Is dialdehyde starch a valuable cross-linking agent for collagen/elastin based materials? Journal of Materials Science: Materials in Medicine, 27.
48. FAO, 2016. The State of World Fisheries and Aquaculture 2016. FAO. Rome, parte I.
49. Sugiyama, M., Kousu, S., Hanabe, M., & Okuda, Y. (1989). Chemical properties. In Sugiyama M., Kousu S, Hanabe M., & Okuda Y. (Eds.), Utilization of squid. New Dheli: Oxonian Press. 251 p.
50. Sujithra, S., Kiruthiga, N., Prabhu, M.J., Kumeresan, R.. (2013). Isolation And Determination Of Type I Collagen from Tilapia (*Oreochromis niloticus*) waste . International Journal of Engineering and Technology (IJET).
51. Surewicz, W. K., Mantsch, H.H. (1988). New insight into protein secondary structure from resolution-enhanced infrared spectra. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) /Protein Structure and Molecular. 952, 115-130.
52. Susi, H., Ard, J.S., Carroll, R.J., 1971. The infrared spectrum and water binding of collagen as a function of relative humidity. Biopolymers 10, 1597-1604.
53. Szpak, Paul. (2011). "Fish bone chemistry and ultrastructure: implications for taphonomy and stable isotope analysis". Journal of Archaeological Science. 38 (12): 3358–3372.
54. Takahashi T. and Yokoyama W. (1954) . Physico-chemical studies on the skin and leather of marine animals--XII. Nippon Suisan Gakkaishi 20, 525-529.
55. Takarina, N. D., Nasrul, A. A., and Nurmarina, A. (2017). Degree of Deacetylation of Chitosan Extracted from White Snapper (*Lates sp.*) Scales Waste. International Journal of Pharma Medicine and Biological Sciences Vol. 6, No. 1.
56. Tan Y., Chang Sam K.C. (2018). Isolation and characterization of collagen extracted from channel catfish (*Ictalurus punctatus*) skin. Food Chemistry. Volume 242, Pages 147-155.

57. Toldrá, F., Aristoy, M., Mora, L., Reig, M. (2012). Innovations in value-addition of edible meat by-products. *Meat Science* 92 (3): 290-296.
58. Vidal, B. D., Mello, M. L. S. (2011). Collagen Type I Amide I Band Infrared Spectroscopy *Micron* , 42 (3)283– 289.
59. Vojdani, F. (1996). Solubility. In G. M. Hall (Ed.), *Methods of testing protein functionality* (1st ed.). (pp. 11 - 60) Great Britain: St Edmundsbury Press.
60. Wong, DWS (1989). *Mechanism and theory in food chemistry*. Van Nostrand Reinhold, New York
61. Wu, W., Qian, X., Huang, Y., Hong, Q. (2012). A review of the control of clonorchiasis sinensis and *Taenia solium* taeniasis/cysticercosis in China. *Parasitology Research*, Vol.111(5), pp.1879-1884.
62. Yan M, Li B, Zhao X, Ren G, Zhuang Y, Hou H, Zhang X, Chen L, Fan Y. (2008). Characterization of acid-soluble collagen from the skin of walleye pollack (*Theragra chalcogramma*) *Food Chem.* 107:1581–1586.
63. Zaku, S. G., Emmanuel, S. A., Aguzue, O. C., and Thomas, S. A. (2011). “Extraction and characterization of chitin, a functional biopolymer obtained from scales of common carp fish (*Cyprinus carpio L.*): a lesser known source,” *African Journal of Food Science*, vol. 5, no. 8, PP. 478-483,
64. Zhu, X.-P., Kimura, S. (1991). Thermal stability and subunit composition of muscle and skin