

**CENTRO FEDERAL DE EDUCAÇÃO TECNOLÓGICA DE MINAS GERAIS
(CEFET-MG)**

Anna Karolina Vilela Freitas

**DESENVOLVIMENTO DE MÉTODO PARA A EXTRAÇÃO DO
COLÁGENO A PARTIR DO RESÍDUO DA INDÚSTRIA DO
PROCESSAMENTO CARNES DE RÃ-TOURO E AVALIAÇÃO DO
PRODUTO PARA USO INDUSTRIAL**

Belo Horizonte (MG)

2020

Anna Karolina Vilela Freitas

**DESENVOLVIMENTO DE MÉTODO PARA A EXTRAÇÃO DO
COLÁGENO A PARTIR DO RESÍDUO DA INDÚSTRIA DO
PROCESSAMENTO DE CARNES DE RÃ-TOURO E AVALIAÇÃO DO
PRODUTO PARA USO INDUSTRIAL**

**Dissertação de Mestrado
apresentada ao Programa de Pós
Graduação Multicêntrico de
Química em Minas Gerais (PPGQ)
do CEFET-MG apresentado como
requisito parcial para a obtenção
do título de Mestre em Química.
Orientadora: Prof.^a Dr.^a Patrícia
Santiago de Oliveira Patricio. Co-
orientadora: Dr.^a Ana Pacheli
Heitmann Rodrigues**

**CEFET-MG
Belo Horizonte (MG)**

2020

Anna Karolina Vilela Freitas

**DESENVOLVIMENTO DE MÉTODO PARA A EXTRAÇÃO DO
COLÁGENO A PARTIR DO RESÍDUO DA INDÚSTRIA DO
PROCESSAMENTO DE CARNES DE RÃ-TOURO E AVALIAÇÃO DO
PRODUTO PARA USO INDUSTRIAL**

**Dissertação submetida ao corpo docente do
Programa de Pós Graduação Multicêntrico de
Química em Minas Gerais (PPGQ) do CEFET-MG como
parte dos requisitos necessários para a obtenção do
grau de mestre em Química.**

Belo Horizonte, 13 de março de 2020

**Prof.^a Dr.^a Patrícia Santiago de Oliveira Patricio
(Orientadora – CEFET-MG)**

**Dr.^a Ana Pacheli Heitmann Rodrigues
(Co-orientadora – CEFET-MG)**

**Dr. Prof. Ildefonso Binatti
(Avaliador – CEFET-MG)**

**Prof.^a Dr.^a Camina B. Gil
(Avaliadora – CEFET-MG)**

DEDICATÓRIA

*Á Deus, minha fonte de força e amor incondicional.
Aos meus pais, Roberto e Silvânia, pelo carinho e
valores. À minha irmã, Anielle, por todo apoio. Ao
meu namorado, familiares, amigos, professores,
minhas orientadora e co-orientadora, pelo carinho e
assistência necessária para que eu chegasse até aqui.*

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por ser minha fonte de fé, força e amor incondicional. Por sempre me dar o que preciso para persistir. A Nossa Senhora das Graças por ser minha fonte de graça diária e me oferecer todas as graças que necessito. Agradeço aos meus pais pela educação, exemplo, por darem o seu melhor para que eu me mantenha e por sempre batalharem para que eu chegasse até aqui. Por nunca medirem esforços para que eu tenha educação e para que eu seja uma boa profissional e ser humano. Agradeço a minha irmã por sempre me ajudar a persistir. Por um dia ter me colocado no colo e ter conversado comigo. Para que eu soubesse separar as coisas e dedicar não só ao trabalho, mas a mim. Por me dar broncas para que eu seja uma profissional melhor, para que eu viva bem comigo mesma e para que eu acredite em mim. Ao meu namorado por estar sempre ao meu lado, por estar sempre disposto, por acreditar em mim, por me tirar da rotina quando eu estava prestes a desesperar e por me ajudar a corrigir as referências desse trabalho. Por me amar e ser meu melhor amigo. As minhas orientadoras pelos conselhos profissionais, de escrita, conhecimento, dicas de como fazer melhor e ser melhor. Vocês fizeram toda diferença nesse trabalho. Aos meus amigos que são minha família quando a minha está longe. Por serem meus parceiros de festa e por me ajudarem a finalizar esse trabalho. Aos antigos e aos novos. OBRIGADA! Aos maravilhosos integrantes do lab que me ajudaram a mexer as rãs, ficar de olho na temperatura, olhar se a gota acabou, e pelas demais “N” ajudas no lab. Vocês fizeram parte e fazem parte do sucesso desse trabalho. A minha família que estava distante mas que sempre que possível me tirava da rotina, me alegrava em fins de semana no sítio ou na casa de vó. Pelos sorrisos, confiança e amor. A cada funcionário do CEFET que sempre estava a disposição para me ajudar, seja com uma xícara de café, bom papo ou empréstimo de chave. Agradeço a cada um que me permitiu chegar até aqui. Vocês fazem parte desse final feliz!

RESUMO

FREITAS, A. K. V.; PATRICIO, P.S.O.; RODRIGUES, A. P. H.

DESENVOLVIMENTO DE MÉTODO PARA A EXTRAÇÃO DO COLÁGENO A PARTIR DO RESÍDUO DA INDÚSTRIA DO PROCESSAMENTO DE CANES DE RÃ-TOURO E AVALIAÇÃO DO PRODUTO PARA USO INDUSTRIAL

O colágeno é uma proteína fibrosa capaz de fornecer resistência e elasticidade às estruturas anatômicas as quais está presente como constituinte. Diversos usos podem ser atribuídos aos materiais colagênicos, que se destacam nas indústrias de cosméticos, alimentícia e farmacêutica. Em sua maioria, o colágeno é extraído a partir do couro de mamíferos. No entanto, o surto de doenças nesse tipo de animal leva-nos à necessidade de buscar fontes alternativas para sua obtenção. Dentre os potenciais substitutos, destacam-se os anfíbios, especificamente a Rã-touro. Com o aumento do consumo desse animal gera-se um resíduo nobre, pouco aproveitado, que necessita de opções de destinação adequada. O presente trabalho tem como objetivo propor um método eficiente para a extração de colágeno do resíduo de rã touro e avaliar seu desempenho como substituição ao colágeno de mamíferos. A extração do colágeno foi realizada com sucesso, apresentando um rendimento médio de 0,01353 g/g de pele. Os produtos obtidos foram caracterizados por FTIR, TG e DSC, apresentando resultados característicos para uma amostra de colágeno, segundo a literatura. O pH apresentou uma variação de 4 a 6,5 e o teor médio de cinzas, inferior a 2 %. O comportamento mecânico do filme de colágeno foi obtido pelo ensaio de tração. O teor de nitrogênio total e proteína bruta das peles, patas e do colágeno extraído foi determinado, apresentando um valor médio de 57,4 % para colágeno das peles e 55,7 % para colágeno das patas. Os resultados mostram que a partir da pele de rã touro é possível obter colágeno do tipo hidrolisado. O produto apresentou características interessantes que são pré-requisitos para aplicações em diversos setores industriais.

Palavras-chave: Colágeno. Extração. Rã-touro.

ABSTRACT

FREITAS, A. K. V.; PATRICIO, P.S.O.; RODRIGUES, A. P. H.

DESENVOLVIMENTO DE MÉTODO PARA A EXTRAÇÃO DO COLÁGENO A PARTIR DO RESÍDUO DA INDÚSTRIA DO PROCESSAMENTO DE CANES DE RÃ-TOURO E AVALIAÇÃO DO PRODUTO PARA USO INDUSTRIAL

Collagen is a fibrous protein capable of providing resistance and elasticity to the anatomical structures which are present as a constituent. Several uses can be attributed to collagen materials, which stand out in the cosmetics, food and pharmaceutical industries. Most collagen is extracted from mammalian leather. However, the outbreak of diseases in this type of animal leads us to the need to seek alternative sources for obtaining it. Among the potential substitutes, amphibians stand out, specifically the bullfrog. With the increase in the consumption of this animal, a noble waste is generated, little used, which needs options for proper destination. The present work aims to propose an efficient method for the extraction of collagen from bullfrog waste and to evaluate its performance as a substitute for mammalian collagen. Collagen extraction was successfully performed, with an average yield of 0.01353 g/g of skin. The products obtained were characterized by FTIR, TG and DSC, presenting characteristic results for a collagen sample, according to the literature. The pH varied from 4 to 6.5 and the average ash content was less than 2%. The mechanical behavior of the collagen film was obtained by the tensile test. The content of total nitrogen and crude protein in the skins, feet and extracted collagen was determined, with an average value of 57.4% for skin collagen and 55.7% for leg collagen. The results show that it is possible to obtain hydrolyzed collagen from the skin of a bullfrog. The product presented interesting features that are prerequisites for applications in several industrial sectors.

Palavras-chave: Collagen. Extraction. Bullfrog.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1: Desenho esquemático dos níveis estruturais das proteínas (http://www.euquerobiologia.com.br/2017/12/tipos-estruturas-proteinas.html)	22
Figura 2: Estrutura química do aminoácido ionizado	22
Figura 3: Representação esquemática da reação química de desidratação molecular e formação da ligação peptídica entre aminoácidos (TRINDADE, 2018)	23
Figura 4: Representação esquemática da perda da conformação espacial de uma proteína nativa quando desnaturada (http://www2.fct.unesp.br)	24
Figura 5: Aminoácidos (aa) essenciais que constituem uma proteína	26
Figura 6: Estrutura de uma proteína globular (https://thumbs.dreamstime.com/b/prote%C3%ADna-globular-671524.jpg)	27
Figura 7: Estrutura química de a) aldeído b) amina.....	28
Figura 8: Esquema do processo de formação da estrutura de colágeno (DAMODARAN, 2010; SILVA, 2012).....	29
Figura 9: Esquema ilustrativo do processo de agregação paralela das cadeias de colágeno tipo I (GOISSIS 2008).....	30
Figura 10: Propriedades mecânicas da fibra de colágeno (MOW; HUNG, 2003) .	31
Figura 11: Modelo de uma alfa-hélice da molécula de colágeno.....	32
Figura 12: Estruturas químicas dos aminoácidos presentes na molécula de colágeno.....	33
Figura 13: Cadeia de aminoácidos de uma estrutura de colágeno (MORAES, 2012; OAKENFULL, 1997).....	34
Figura 14: Representação esquemática da extração da gelatina de matéria prima animal - (NASCIMENTO, 2016).	38
Figura 15: Rã-touro	44
Figura 16: Ciclo de vida da rã touro	45
Figura 17: Linha do tempo dos trabalhos realizados a respeito do colágeo de rã e suas respectivas descobertas.....	48
Figura 18: Amostra de colágeno obtida na extração 8.0 a) não filtrado; b) filtrado	54
Figura 19: Fotografia dos agitadores mecânicos a) modelo Fisaton e b) modelo IKA.....	55

Figura 20: Fluxograma do processo pré-tratamento das pele e patas para o processo de extração de colágeno.....	60
Figura 21: Fluxograma do processo de extração de colágeno tipo filme e gel.....	61
Figura 22: Fluxograma dos processos de caracterização das amostras de colágeno.....	62
Figura 23: Filmes de colágeno utilizados no ensaio de tração	63
Figura 24: Fotografia do couro de rã superior (a) inferior (b) e patas de rã (c) fornecido pela empresa Frigorã	68
Figura 25: Fotografia Couro da rã durante o processo de limpeza com solução de a) Cloreto de Sódio (NaCl) e b) Hidróxido de Sódio (NaOH) c) Ácido Acético (CH ₃ COOH).....	69
Figura 26: Registro fotográfico da pele de rã triturada.....	70
Figura 27: Fotografia do colágeno: a) em gel e b) filme.....	72
Figura 28: Fotografia do filme de colágeno 9.5 armazenado destampado	72
Figura 29: Imagens do teste de ângulo de contato e absorção de água do filme da reação 8.4 (grupo A) armazenada sob refrigeração sem tampa.....	76
Figura 30: Imagens do teste de ângulo de contato e absorção de água do filme da reação 9.2 (grupo B) armazenada sob refrigeração sem tampa	76
Figura 31: Imagens do teste de ângulo de contato e absorção de água do filme da reação 9.5 (grupo C) armazenada sob refrigeração sem tampa.....	76
Figura 32: Imagens do teste de ângulo de contato e absorção de água do filme da reação 9.31 (grupo C) armazenado sob refrigeração com tampa.....	77
Figura 33: Esquema da determinação da molhabilidade de uma superfície de acordo com seu ângulo de contato.....	78
Figura 34: Curva de tensão à tração por deformação do filme de colágeno 9.5..	82
Figura 35: Amostras de gel após processo de liofilização a) no frasco armazenado; b) fragmentos do colágeno liofilizado.....	83
Figura 36: Amostras de colágeno liofilizadas: a) pele b) pata	84
Figura 37: Registro fotográfico do colágeno comercial hidrolisado em pó (CC)....	88
Figura 38: Espectros de absorção na região do infravermelho da amostra de colágeno de rã 8.0	88
Figura 39: Espectro de infravermelho das amostras de colágeno das peles e das patas de rã liofilizadas e do colágeno comercial (CC).....	91

Figura 40: Espectros de FTIR da amostra de colágeno 8.4 submetida a diferentes processos de secagem.....	93
Figura 41: Curvas de a) análise termogravimétrica (TG) e b) DTG das amostras 8.0 e grupo A	96
Figura 42: Curvas de a) análise termogravimétrica (TG) e b) DTG das amostras do grupo B.....	96
Figura 43: Curvas de a) análise termogravimétrica (TG) e b) DTG das amostras do grupo C.....	97
Figura 44: Curvas de a) análise termogravimétrica (TG) e b) DTG das amostras do grupo D	97
Figura 45: Curvas de a) TGA e b) DTG da amostra de colágeno comercial em atmosfera de N ₂	97
Figura 46: Curva de TG da amostra 8.4 submetida a diferentes processos de secagem: Liofilizador (LI) e <i>spray dry</i> (SD)	101
Figura 47: Curva de aquecimento da amostra de colágeno 8.4 seca em liofilizador	103
Figura 48: Curva de resfriamento da amostra de colágeno 8.4 seca em liofilizador	103
Figura 49: Curva de aquecimento da amostra de colágeno 8.4 seca em <i>spray dry</i>	104
Figura 50: Curva de resfriamento da amostra de colágeno 8.4 seca em <i>spray dry</i>	104
Figura 51: Curva de aquecimento da amostra de colágeno 9.31	106
Figura 52: Curva de resfriamento da amostra 9.31	106
Figura 53: Curva de aquecimento da amostra de colágeno 8.3	107
Figura 54: Curva de resfriamento da amostra 8.3.....	107
Figura 55: Fotografia do bloco digestor contendo a amostra de colágeno após a digestão.....	113
Figura 56: Fotografia do tubo contendo as amostras após adição de NaOH 40% m/v a) amostras com quantidade de água ideal b) amostra com quantidade de água em excesso	114
Figura 57: Fotografia das amostra de colágeno antes da titulação (verde) e após titulada com HCl 0,1 mol.L ⁻¹ (rosa).....	114

Figura 58: Espectros de absorção na região do infravermelho das amostras 8.0 e grupo A.....	132
Figura 59: Espectros de absorção na região do infravermelho das amostras do grupo B.....	133
Figura 60: Espectros de absorção na região do infravermelho das amostras do grupo C.....	133
Figura 61: Espectros de absorção na região do infravermelho das amostras do grupo D (patas de rã).....	134

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Perfil de aminoácidos na proteína do colágeno tipo I; seus resíduos nas cadeias Alfa-1 e Alfa-2 (GOISSIS, 2008).....	33
Tabela 2: Classes, tipos e localização de 14 diferentes tipos de colágenos presentes no corpo	35
Tabela 3: Composição do (resultados expressos em g/1000 g de proteína) (Adaptado de LI et al. 2003 ¹ ; Gudmundsson,1997 ²).....	46
Tabela 4: Processos de extração de colágeno, suas respectivas modificações e observações realizadas nos anos de 2017 a 2019	56
Tabela 5: pH das amostras de colágeno em gel	73
Tabela 6: Ângulo de contato das amostras de filme de colágeno 8.4 (grupo A), 9.2 (grupo B), 9.5 (grupo C) e 9.31 (grupo C)	79
Tabela 7: Resultados do teste de tração com cinco filmes de colágeno de rã da amostra 9.5	80
Tabela 8: Parâmetros obtidos na determinação do teor de minerais fixos (cinzas)	85
Tabela 9: Representação das bandas do espectro de infravelho (Figura 41) – (RIAZ, 2018)	89
Tabela 10: Amostras de colágeno e respectivos número de onda das bandas características	92
Tabela 11: Razão entre as bandas de 1235 cm^{-1} e 1450 cm^{-1} das amostras de colágeno de rã e comercial	94
Tabela 12: Comparativo do número de onda dos espectros de colágeno de rã dos trabalhos de (a) Sai e Babu (2001), (b) Li (2003), (c) Wang (2011), (d) Souza (2015), (e) Zhang, Duan (2017), (f) Karnjanapratuma (2017) e (g) trabalho em questão.....	95
Tabela 13: Temperatura inicial e final dos eventos térmicos evidenciados nas curvas da análise TermoGravimétrica	98
Tabela 14: Perdas de massa dos eventos térmicos evidenciados nas curvas da análise TermoGravimétrica	99
Tabela 15: Teor médio percentual de colágeno por grama de gel da amostra 8.0 e dos grupos A, B, C e D.....	109
Tabela 16: Teor de colágeno das amostra 9.32, 9.41 e 9.42 pelos processos de secagem em estufa (I) e liofilização (II).....	110

Tabela 17: Rendimento médio da extração de colágeno das amostras dos grupos A, B e C	111
Tabela 18: Relação entre rendimento e temperatura	112
Tabela 19: Quantidade de Nitrogênio total (NT) e proteína bruta (PB) média das amostras de colágeno em gel liofilizadas dos grupos A, B, C e D, pede e pata <i>in natura</i> e amostra 8.0	115
Tabela 20: Teor de Nitrogênio Total (NT) e Proteína Bruta (PB) para as amostras de colágeno dos grupos A, B, C e D, e a amostra 8.0	116

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

Ácido acético (CH_3COOH)

Ácido cítrico ($\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7$)

Ácido sulfúrico (H_2SO_4)

Amino ácidos (aa)

American Society for Testing and Materials (ASTM)

Association of Analytical Chemists (AOAC)

Cloreto de sódio (NaCl)

Colágeno Hidrolisado (CH)

Calorimetria exploratória diferencial (Do inglês *Differential Scanning Calorimetry*, DSC)

Desvio Padrão (D.P.)

Encefalopatia espongiforme bovina (Do inglês *Bovine spongiform encephalopathy*, BSE)

Encefalopatia espongiforme transmissível (Do inglês *Transmissible spongiform encephalopathy*, TSE)

Espectroscopia de na região do Infravermelho com Transformada de Fourier (Do inglês *Infrared spectroscopy with Fourier Transform*, FTIR)

Estados Unidos da América (EUA)

Febre aftosa (FA)

Fator de correção (fc)

Glicina (Do inglês *Glycine*, Gly)

Hidróxido de cálcio ($\text{Ca}(\text{OH})_2$)

Hidróxido de sódio (NaOH)

Hidroxilina (Do inglês *Hydroxylin*, Hyd)

Hidroxiprolina (Do inglês *Hydroxyproline*, Hydp)

Infravermelho (IR)

Nitrogênio total (NT)

Potencial Hidrogeniônico (pH)

Prolina (Do inglês *Proline*, Pro)

Sólidos Totais (ST)

Transição vítrea (Td)

Ultra-Violeta (UV)

Umidade Relativa (UR)

Gás Oxigênio (O₂)

Gás Nitrogênio (N₂)

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO	19
2.	OBJETIVOS	21
2.1	Objetivos específicos	21
3.	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	22
3.1	Proteínas: propriedades, estruturas e características	22
3.2	A desnaturação das proteínas	24
3.3	Colágeno	25
3.4	Formação e Estrutura do Colágeno (tipo I)	27
3.5	Composição química do colágeno tipo I.....	31
3.6	Tipos de colágeno.....	35
3.7	Colágeno hidrolisado e Gelatina	37
3.8	Metodologias de extração de fontes clássicas e alternativas de colágeno	39
3.9	Rã – touro	44
3.10	Colágeno de Rã.....	46
3.11	Metodologias de extração.....	49
3.12	Aplicações do colágeno	50
3.13	Determinação da qualidade do colágeno – Método Kejedahl	51
4.	MATERIAIS E MÉTODOS	53
4.1	Reagentes	53
4.2	Procedimentos	53
	<i>Preparação das peles e das patas</i>	60
	<i>Extração do colágeno</i>	60
4.2.1	Caracterização.....	61
4.2.1.1	Determinação do pH das amostras de gel de colágeno	62

4.2.1.2	Determinação do ângulo de contato e da capacidade de absorção de água em filmes de colágeno	62
4.2.1.3	Determinação do comportamento mecânico utilizando o ensaio de tração do filme de colágeno	63
4.2.1.4	Determinação do teor de resíduo mineral fixo (cinzas)	64
4.2.1.5	Espectroscopia de absorção na região do infravermelho (Do inglês <i>Infrared spectroscopy with Fourier Transform, FTIR</i>)	64
4.2.1.6	Análise termogravimétrica (TG)	65
4.2.1.7	Calorimetria exploratória diferencial (Do inglês <i>Differential Scanning Calorimetry, DSC</i>)	65
4.2.1.8	Determinação de proteínas totais por método de Kjeldahl	65
4.2.1.9	Determinação do teor de colágeno por grama de gel	67
4.2.1.10	Determinação do rendimento da extração	67
5.	RESULTADOS E DISCUSSÃO	68
5.1	Pré – tratamento	68
5.2	Extração do colágeno da rã touro	70
5.3	Caracterizações	73
5.3.1	<i>Medidas do pH</i>	73
5.3.2	<i>Determinação da absorção de água em filmes de colágeno e ângulo de contato</i>	75
5.3.3	<i>Determinação das propriedades mecânicas do filme de colágeno</i>	80
5.3.4	<i>Liofilização dos geis de colágeno</i>	83
5.3.5	<i>Determinação do teor de resíduo mineral fixo (cinzas)</i>	84

5.3.6	<i>Espectroscopia de absorção na região do infravermelho com Transformada de Fourier (Do inglês Infrared spectroscopy with Fourier Transform, FTIR)</i>	87
5.3.7	<i>Análise termogravimétrica (TG)</i>	96
5.3.8	<i>Calorimetria exploratória diferencial (Do inglês Differential Scanning Calorimetry, DSC)</i>	102
5.3.9	<i>Determinação do teor de colágeno por grama de gel</i>	108
5.3.10	<i>Rendimento do processo extração</i>	111
5.3.11	<i>Determinação de proteínas totais por método de Kjeldahl</i>	113
6.	CONCLUSÃO	118
7.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	120

1. INTRODUÇÃO

As proteínas são macromoléculas biológicas formadas por longas cadeias de aminoácidos, cujas sequências e estruturas química podem variar. Assim, cada proteína tem uma conformação nativa (DEISENHOFER, 2001) e função biológica específica (FERRARO, 2017).

Dentre as principais proteínas constituintes dos seres vivos encontra-se o colágeno representando 30% da proteína total (FERRARO, 2017), presente na pele, nos ossos, vasos sanguíneos, cartilagens e na matriz extracelular (HORTN, 2018). O colágeno desempenha importantes funções no organismo, como por exemplo: mantém a estrutura física tecidual e organização macromolecular (LODISH, 2000).

O colágeno é aplicado em diversas áreas, como na engenharia de tecidos, de alimentos, indústria de cosméticos, farmacêutica e na medicina (LIU, et al., 2017). Ela é utilizada na fabricação de implantes vítreos, suporte para enzimas, produção de compostos biologicamente ativos, fabricação de biomateriais, no tratamento de doenças angiogênicas, hipertensão, incontinência urinária e osteoartrite (ZHANG et al., 2004).

A vasta aplicabilidade da proteína de colágeno deve-se as suas propriedades biológicas como a biocompatibilidade, biodegradabilidade, ampla capacidade de adesão celular, baixa antigenicidade (LIU, et al., 2017) baixo índice de reações imunológicas, capacidade de formar fibras (LEE, 2001) e novos tecidos (ZHANG et al., 2004)..

A extração do colágeno pode ser realizada de forma enzimática, em solução ácida ou alcalina. As extrações em solução ácida levam a obtenção de um colágeno de grau de pureza relevante, sendo a extração com ácido acético a que apresenta maior rendimento (OLIVEIRA, 2017).

No Brasil, a principal fonte de colágeno é proveniente dos resíduos da indústria de carne de bovinos e suínos, devido a grande quantidade de indústrias cárneas para importação e exportação do produto dessa origem animal. No entanto, a alta probabilidade de contaminação do colágeno por zoonoses derivadas desses mamíferos, levou aos estudiosos a buscarem

fontes alternativas mais seguras para extração da referida proteína (ZHANG et al., 2004). Os principais trabalhos, citados na literatura científica são provenientes de peixes (NAGAI e SUZUKI, 2000; KIM, 2006; ZHANG, Y. et al., 2007; HUANG, et al., 2011; ALFARO et al., 2012; NERI, 2013; VEERURAJ et al., 2015; PAL et al., 2015; SILVA, 2018; NORMAH, 2018; PARK, 2019; LI et al. 2020) e de rãs (SAI; BABU, 2001; LI, et al., 2003; LIN e LIU, 2006; WANG, 2011; SOUZA, 2015; ZHANG e DUAN, 2017; KARNJANAPRATUM, 2017; TÜMERKAN, 2019) uma vez que apresentam baixos riscos de transmissão de doenças, ausência de toxicidade e elevados rendimentos.

A rã-touro, um anfíbio nativo da América do Norte vem ganhando espaço no setor alimentício, levando em conta a composição nutricional da carne. Ela apresenta 15,99% de proteína e baixo teor de lipídeos ($0,16\% \pm 0,07$) (MELLO, 2006), comparada com a carne bovina 22,8% de proteína e 2% de lipídeos (ROÇA, 2012). Esse consumo contribui diretamente para a geração de pele residual, que não é utilizada pela indústria alimentícia. Atualmente o resíduo da produção é destinado, em sua maioria, à compostagem. Entretanto, há um elevado teor de colágeno na pele e outras partes da rã-touro que são descartadas (FERREIRA et al., 2006).

Levando em consideração as vantagens que a proteína de colágeno apresenta e sua vasta aplicação, o presente trabalho busca extrair de forma eficiente e prática a proteína proveniente da pele da rã- touro e caracterizá-lo acerca das suas características físico-químicas.

2. OBJETIVOS

O objetivo principal desse trabalho é extrair e caracterizar o colágeno a partir do resíduo de couro de rã-touro, com elevado rendimento.

2.1 Objetivos específicos

Os objetivos específicos desse trabalho foram:

- Desenvolver um método eficiente para a extração do colágeno tipo I a partir do resíduo da indústria de carne de Rã-touro;
- Atestar a reprodutibilidade da metodologia;
- Propor uma metodologia de extração passível de escalonamento;
- Determinar o rendimento para a extração do colágeno proposta;
- Determinar a temperatura de desnaturação do colágeno obtido;
- Caracterizar as propriedades físico-químicas dos produtos obtidos;

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 Proteínas: propriedades, estruturas e características

As proteínas são macromoléculas biológicas formadas por cadeias longas contendo pelo menos 50 aminoácidos ligados por ligações peptídicas (DEISENHOFER, 2001). Sua estrutura é classificada como primária (sequência de aminoácidos), secundária (sequência de aminoácidos em espiral - α hélice), terciária (enovelamento da cadeia secundária) e quaternária (duas ou mais cadeias polipeptídicas agrupadas) – Figura 1.

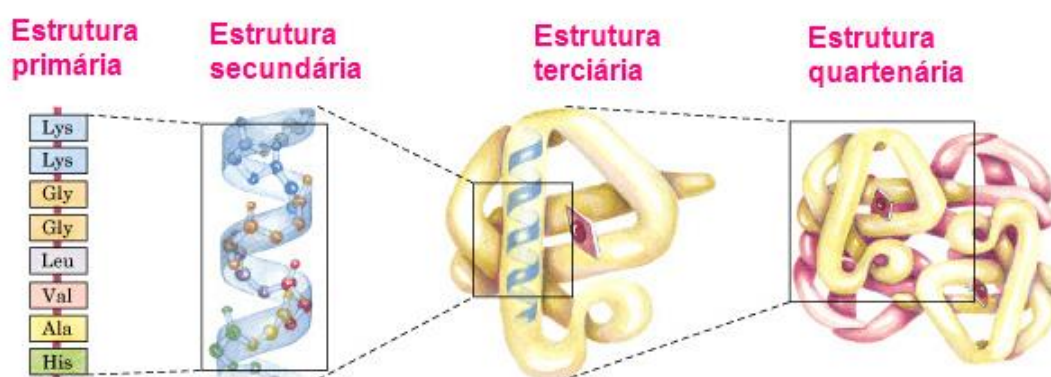


Figura 1: Desenho esquemático dos níveis estruturais das proteínas (<http://www.euquerobiologia.com.br/2017/12/tipos-estruturas-proteinas.html>)

Os aminoácidos (aa) são compostos formados por um grupo amina ($-\text{NH}_2$), um grupo carboxila ($-\text{COOH}$) e uma cadeia lateral R, conectados a um carbono central – conforme mostrado na Figura 2.

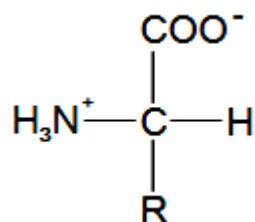


Figura 2: Estrutura química do aminoácido ionizado

Os peptídeos são formados por meio das ligações peptídicas entre os aminoácidos. Em uma reação de desidratação, os grupos carboxila (COO^-) e amina (NH_3^+) protonados das moléculas dos aminoácidos se

conectam por uma ligação covalente formando os peptídeos. Desta forma, tem-se um grupo amina em uma extremidade e um grupo carboxílico na outra, nomeados N-terminal e C-terminal, respectivamente – Figura 3 (TRINDADE, 2018). O grupo R presente na estrutura, caracteriza e diferencia os aminoácidos, permitindo que tenham uma identidade única: estrutura química, localização e função.

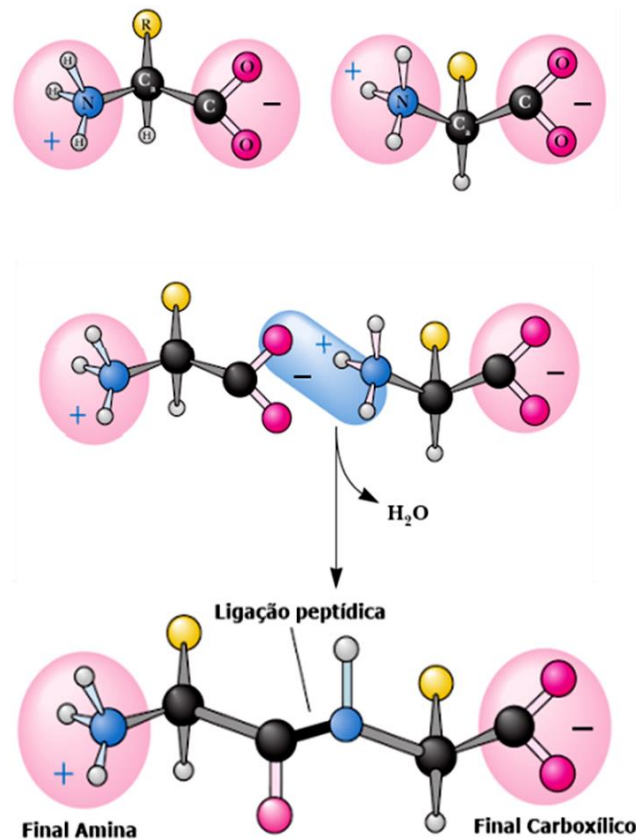


Figura 3: Representação esquemática da reação química de desidratação molecular e formação da ligação peptídica entre aminoácidos (TRINDADE, 2018)

Existem diferentes tipos de proteínas, especializadas e particulares. Elas variam de acordo com os mecanismos biológicos e as funções que exercem. As proteínas presentes no organismo humano apresentam características complexas e sofisticadas, o que lhes confere funções importantes onde estão presentes. Além de desempenharem funções biológicas, elas constituem matérias primas para a construção dos tecidos

da pele e dos cabelos, como as proteínas do colágeno e da queratina, respectivamente (ALBERTS, 2002).

3.2 A desnaturação das proteínas

O termo desnaturação refere-se à uma grande variedade de alterações estruturais, com diferentes efeitos sobre as proteínas de forma individual. A desorganização estrutural dessa conformação ou do seu arranjo, pode alcançar uma destruição total, ou parcial (BRANDTS; HUNT, 1967).

Ao submeter a proteína a uma temperatura inferior a 50 °C durante um certo período de tempo, a estrutura nativa sofre um desenovelamento ou desenrolamento, ou seja, uma desnaturação parcial. Se superior a essa temperatura, as ligações podem ser quebradas, ocorrendo assim, uma desnaturação total da proteína.

Cada proteína tem sua conformação nativa, desta forma, o tempo e a temperatura para que o evento ocorra, pode variar (BRANDTS; HUND, 1967; KIM, 2006; GORGIEVA, 2011).

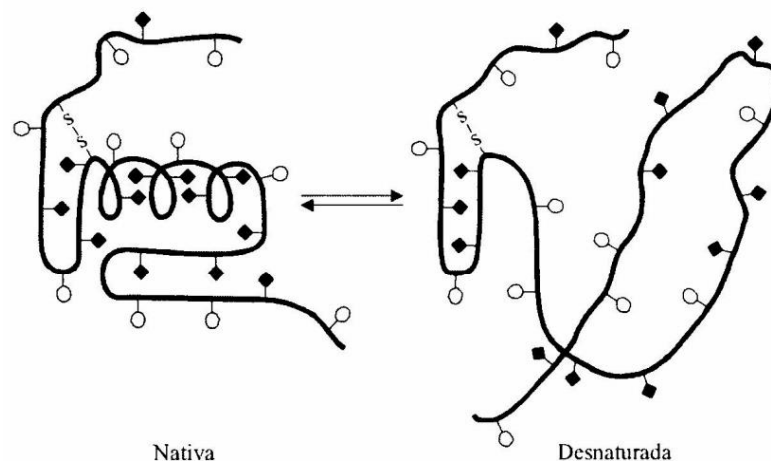


Figura 4: Representação esquemática da perda da conformação espacial de uma proteína nativa quando desnaturada (<http://www2.fct.unesp.br>)

Embora modificações nas estruturas secundárias, terciárias e quaternárias sejam promovidas, as ligações peptídicas não são quebradas

(UCKO, 2007). Um aquecimento severo leva à transformação irreversível da estrutura helicoidal da proteína (BRANDTS; HUND, 1967).

Ao perder a sua conformação estrutural a proteína perde também a sua atividade biológica. Quando a energia fornecida é moderada, a proteína pode recuperar a sua conformação original. Neste caso, ocorre uma desnaturação reversível (ROSA, 2007; BRANDTS, 1969).

Além da temperatura, o pH, pressão, detergentes, solventes orgânicos como álcool e acetona e solutos como ureia e cloreto de guanidina, são agentes desnaturantes físicos e químicos (ARGELINI, 2011).

Segundo Brandts e Hund (1967), os tecidos colagenosos consistem principalmente de água, o que permite uma renaturação parcial da sua estrutura. Isso ocorre devido à formação de ligações de hidrogênio entre a molécula de água e de colágeno.

3.3 Colágeno

O termo colágeno deriva do grego e significa cola (ALBERTS, 2002). É o principal constituinte dos seres vivos, cerca de 25% da proteína total nos seres humanos, sendo 30% da massa proteica total do corpo (ZEUGOLIS, 2011; LIU, 2017). Apesar de ser importante e abundante, do ponto de vista nutricional é considerada uma proteína não completa, visto que dentre os aa essenciais (Figura 4), está ausente o aa triptofano na estrutura de colágeno (KIM, 2006).

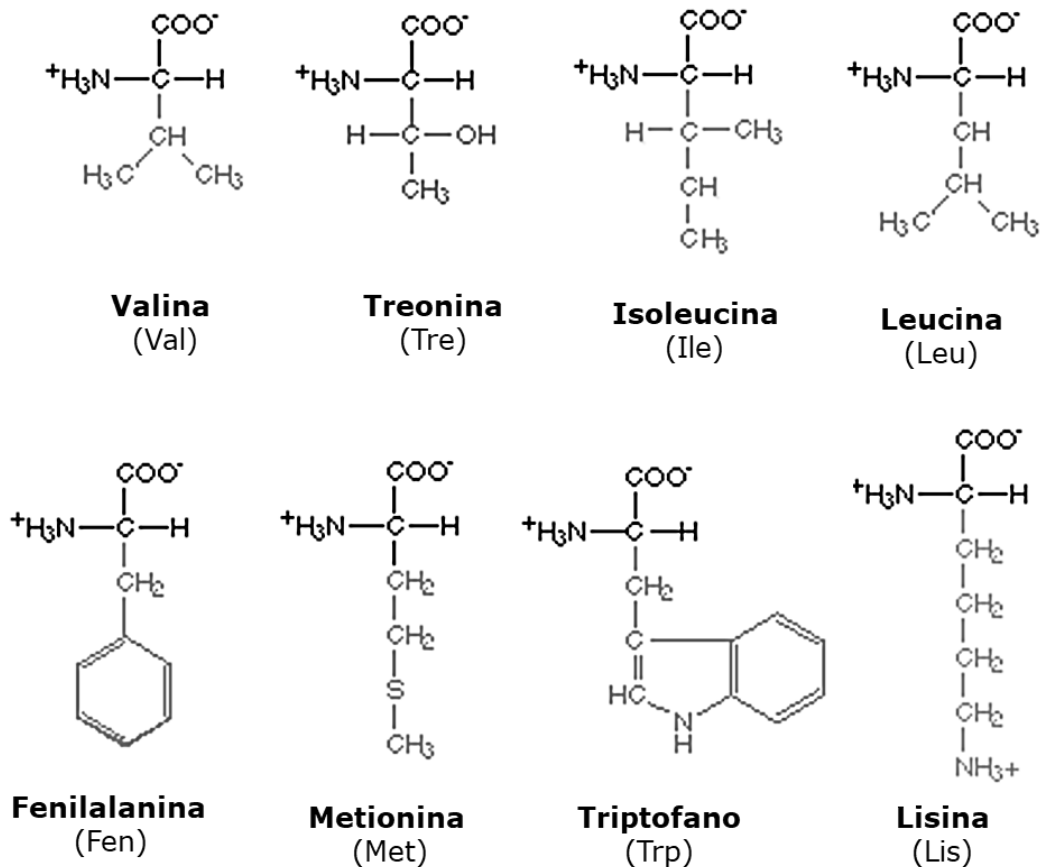


Figura 5: Aminoácidos (aa) essenciais que constituem uma proteína

O colágeno está presente na pele, ossos, vasos sanguíneos, cartilagens e na matriz extracelular em geral, desempenhando uma importante função: mantém a estrutura física tecidual, uma vez que apresenta boa resistência mecânica e confere uma organização macromolecular (FERRARO, 2017; HORTN, 2018).

Os diversos tipos de colágeno diferenciam-se uns dos outros pelas suas propriedades físicas, morfologias, distribuição nos tecidos, cadeias de polipeptídios e pelas funções que exercem no organismo (CHENDRY, 1997).

Apesar de apresentarem características diferentes, sua composição de aminoácidos é semelhante. Trata-se de uma proteína fibrosa, insolúvel, de alto valor comercial, formada por uma cadeia organizada de aminoácidos denominada cadeia α . A combinação de três dessas cadeias α forma uma estrutura em tripla-hélice (GELSE, 2003), conhecida como tropocolágeno.

Os aminoácidos solúveis correspondem cerca de 40% da molécula. Dentre os aminoácidos presentes, 33% glicina, 22% prolina e hidroxiprolina (LEÓN-LÓPEZ, 2019). Em sua forma nativa as fibras de colágeno são insolúveis, mas podem apresentar-se solúveis se forem desnaturadas (OLIVEIRA, 2017).

3.4 Formação e Estrutura do Colágeno (tipo I)

As estruturas de colágeno são derivadas da síntese de moléculas de pró-colágenos solúveis (VARGAS 1997). Essas moléculas depois de sintetizadas são secretadas pelos fibroblastos para o meio extracelular.

Os fragmentos de pró-colágeno contêm nitrogênio (-N) e carbono (-C) peptidases terminais que permitem a clivagem das estruturas globulares – Figura 6 - ligadas às extremidades da molécula (VARGAS, 1997; SILVA, 2012).

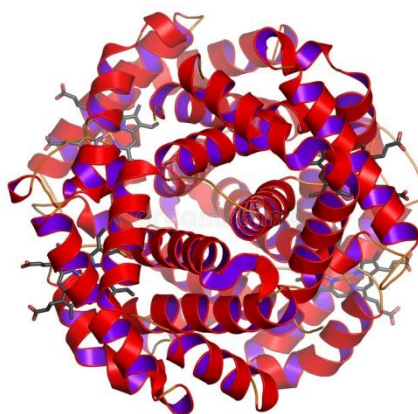


Figura 6: Estrutura de uma proteína globular

(<https://thumbs.dreamstime.com/b/prote%C3%ADna-globular-671524.jpg>)

A interação entre os peptídeos contendo -N e os adjacentes contendo -C permitem que a molécula pró-colágeno (α - hélice enovelada) seja formada. (KWANSA, 2013). As estruturas globulares ocupam um grande espaço em torno da molécula de pró-colágeno, dificultando a formação das estruturas de tropocolágeno. Desta forma, o processo de clivagem das estruturas é iniciado pela ação das enzimas collagenases (NEKLYUDOV, 2003) – Figura 9 .

As moléculas de tropocolágeno unem-se por meio das ligações peptídicas presentes na formação das ligações cruzadas covalentes intermoleculares resultado da interação da carbonila e amina livres – (Figura 7) (SILVA, 2012). Quando formadas, elas polimerizam e formam as fibrilas, que agregadas formarão as fibras de colágeno, que se associarão, formando um feixe de colágeno (NEKLYUDOV, 2003) – (Figura 8).

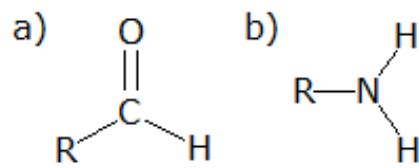


Figura 7: Estrutura química de a) aldeído b) amina

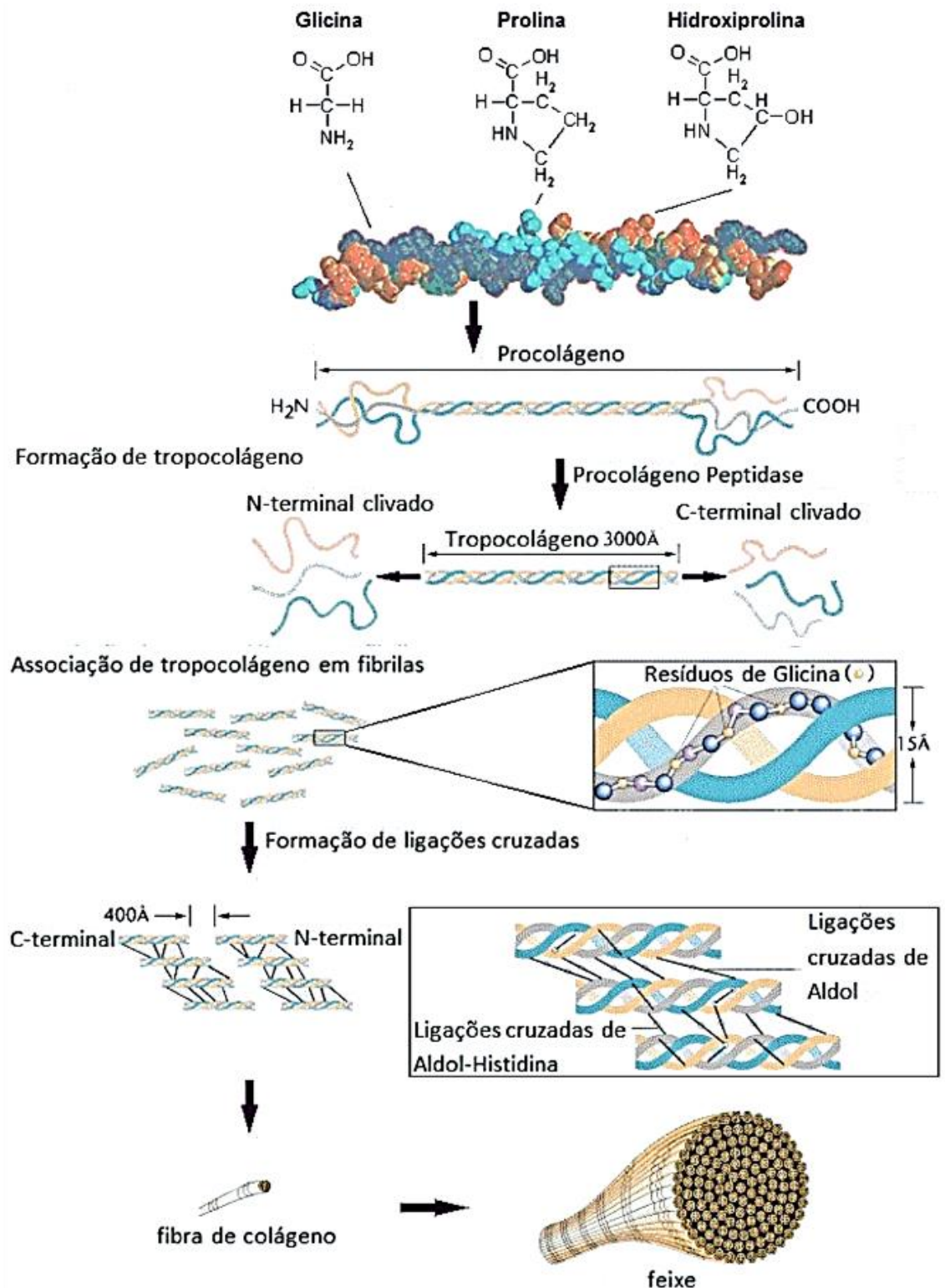


Figura 8: Esquema do processo de formação da estrutura de colágeno (DAMODARAN, 2010; SILVA, 2012)

Cada molécula de colágeno tem um formato de bastão pequeno rígido formado pelo entrelaçamento de três cadeias peptídicas (VARGAS, 1997) que dão origem as fibras de colágeno.

O colágeno tipo I é o colágeno mais abundante no corpo dos mamíferos (ZEUGOLIS, 2011). Cerca de 95% da parte orgânica da matriz óssea (COSTA, 2014) é colágeno. Este tipo de colágeno está presente predominantemente nos ossos, tendões, cápsula de órgãos, córnea e derme (OLIVEIRA, 2017), sendo o principal constituinte da derme reticular, dispostos de vários sentidos, na forma longitudinal, transversal e oblíqua, mas todos paralelos à superfície cutânea (VINARDI, 2007). O colágeno tipo I é formado pela associação de fibras de colágeno (OLIVEIRA, 2017) e é designado como colágeno formador de fibrilas.

As cadeias de aminoácidos são organizadas de forma paralela ao eixo formando as fibras de colágeno, que proporcionarão elasticidade e resistência à estrutura – (Figura 9).

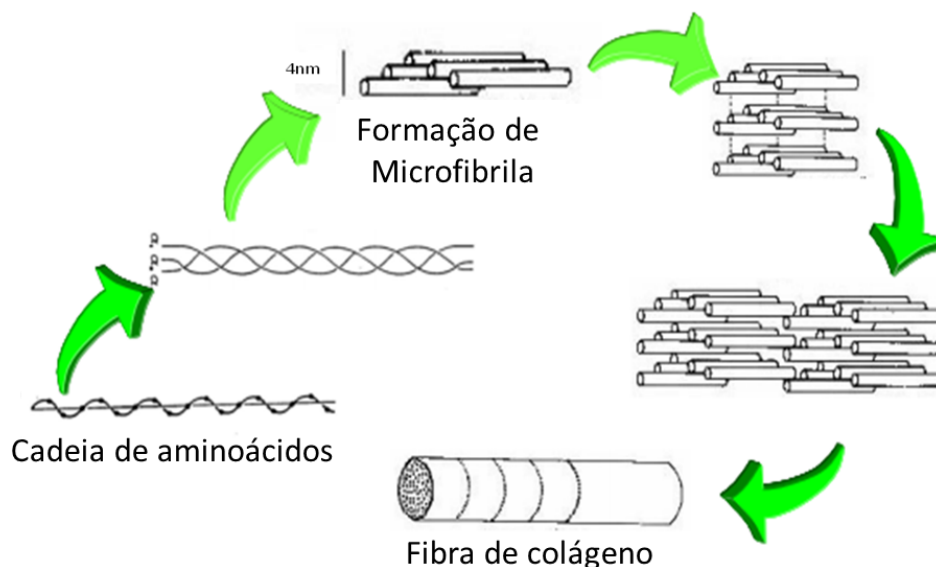


Figura 9: Esquema ilustrativo do processo de agregação paralela das cadeias de colágeno tipo I (GOISSIS 2008)

Em seu estado relaxado, as fibras apresentam-se torcidas. Quando há um aumento gradativo de carga à proteína grandes números de fibras alinham-se à força do estiramento, até que fiquem paralelas. Este

comportamento impõe um limite de extensibilidade da pele, levando a formação de uma curva de tensão e formação de rede, que proporcionará livre mobilidade e resistência à tração e ao estresse (MOW; HUNG, 2003; ROSA, 2007) – (Figura 10).

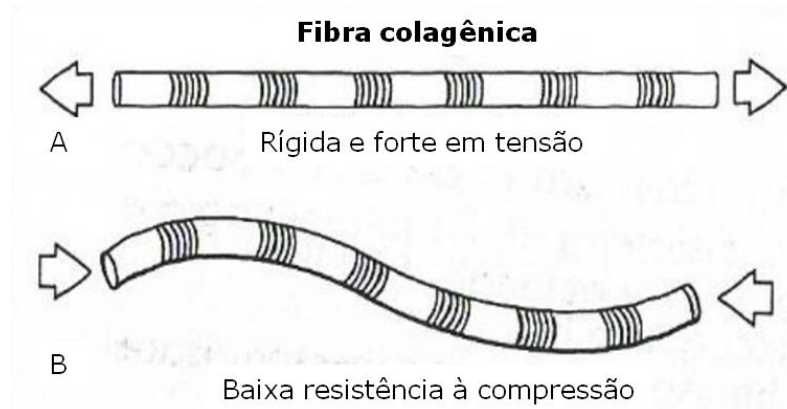


Figura 10: Propriedades mecânicas da fibra de colágeno
(MOW; HUNG, 2003)

As fibras de colágeno, comparadas com seu diâmetro, são extremamente longas (VINARDI, 2007). O tamanho das fibrilas determina a natureza física do tecido e as condições fisiológicas (RODRIGUES, 2009). Cada cadeia é composta por 330 aminoácidos, aproximadamente, formando uma molécula de 280 a 300 nm de comprimento, com massa molecular 300.000 Da ($4,9816 \times 10^{-19}$ g) e 1,5 nm de diâmetro (CHAUNDRY, 1997), com um domínio helicoidal ininterrupto.

Na derme as fibras apresentam uma espessura que varia de 70 nm a 140 nm (KWANSA, 2013). Na forma de fibras (100 nm de espessura) o diâmetro varia de 80 a 160 nm (GOISSIS, 2008). Este sofre um aumento de 20 nm à 70 nm à medida que aumenta a profundidade da derme. A massa molecular é de aproximadamente 100.000 mol/g e, no caso do tipo I, a cadeia A1 tem 1056 resíduos de aminoácidos e a A2, 1038.

3.5 Composição química do colágeno tipo I

O colágeno tipo I é uma macromolécula constituída por três cadeias polipeptídicas (duas α -1 e uma α -2) – (Figura 11) , classificada como heterotrímero (KWANSA, 2013). Estudos a respeito da estrutura

física do colágeno tipo I mostram que ele apresenta uma unidade conhecida como “período D” (CHANDRY, 1997), caracterizada pela distribuição ordenada de aminoácidos. Essa estrutura tem origem na interação das moléculas de tropocolágeno para a formação das estruturas fibrilares que compõe a tripla-hélice e tem participação no controle de eventos biológicos que ocorrem sobre a matriz extracelular (GORGIEVA, 2011; HORTN, 2018).

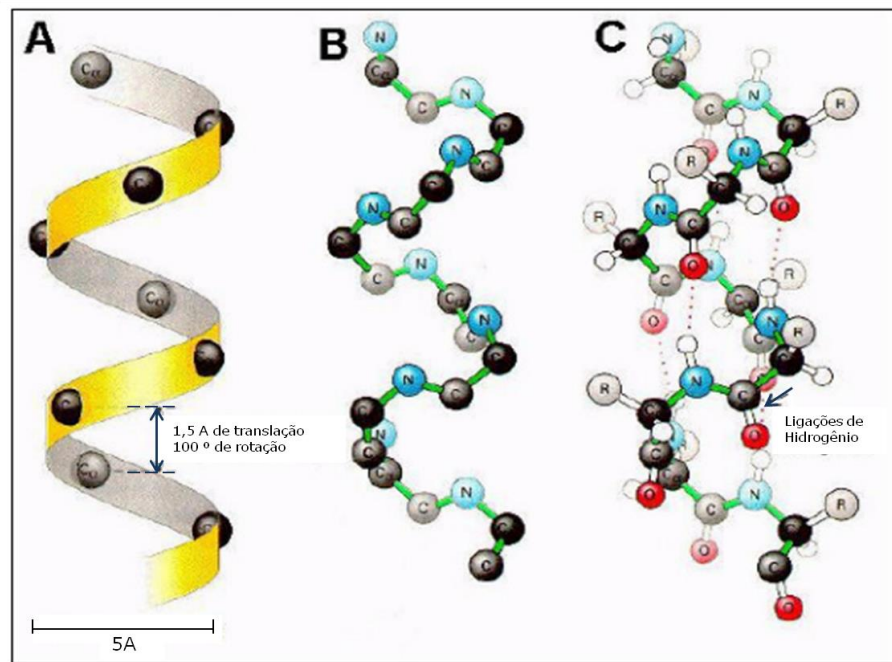


Figura 11: Modelo de uma alfa-hélice da molécula de colágeno (ROSA, 2007)

Assim como a gelatina, ele é composto por um conjunto específico de aminoácidos: Glicina (Gly), Prolina (Pro) e a Hidroxiprolina (Hydp) – (Figura 12).

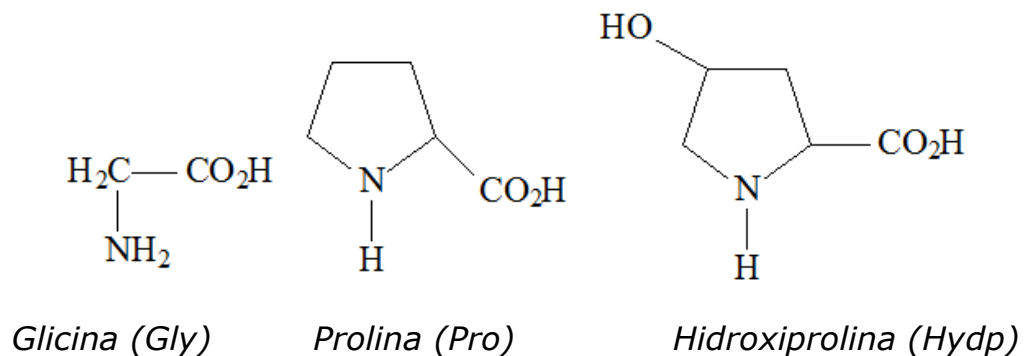


Figura 12: Estruturas químicas dos aminoácidos presentes na molécula de colágeno

A concentração de Gly e Pro na proteína de colágeno é 20 vezes maior que das demais proteínas – Tabela 1, uma característica que diferencia o colágeno das demais proteínas.

Tabela 1: Perfil de aminoácidos na proteína do colágeno tipo I; seus resíduos nas cadeias Alfa-1 e Alfa-2 (GOISSIS, 2008)

Classificação	Aminoácidos	Cadeia Alfa-1	Cadeia Alfa-2
Estruturais	Glicina	345	346
Estruturais	Hidroxiprolina	114	99
Estruturais	Prolina	127	108
Hidrofóbico	Leucina	9	18
Hidrofóbico	Isoleucina	22	33
Hidrofóbico	Metionina	7	4
Hidrofóbico	Fenilalanina	13	15
Hidrofóbico	Tirosina	5	4
Hidrofóbico	Valina	17	34
Básico	Lisina	34	21
Básico	Arginina	53	56
Básico	Histidina	3	8
Básico	Hidroxilisina	4	9
Ácido/Amida	ácido aspártico	33	24
Ácido/Amida	Asparagina	13	23
Ácido/Amida	ácido glutâmico	52	46
Ácido/Amida	Glutamina	27	24
Outros	Alanina	124	111
Outros	Treonina	17	20
Outros	Serina	37	35

As fibras de colágeno são formadas por Gly-Y-X (44%), seguido de Gly-Pro/Hydp-X ou Gly-Pro/Hydp-Pro/Hydp (27%) e Gly-X-Pro/Hydp (20%) – (Figura 13) (LEÓN-LÓPEZ, 2019). A posição X, normalmente ocupada pela Hidroxiprolina (Hyp), pode ser representada por qualquer outro tipo de aminoácido, exceto triptofano, representa uma modificação pós-traducional (OLIVEIRA, 2017)

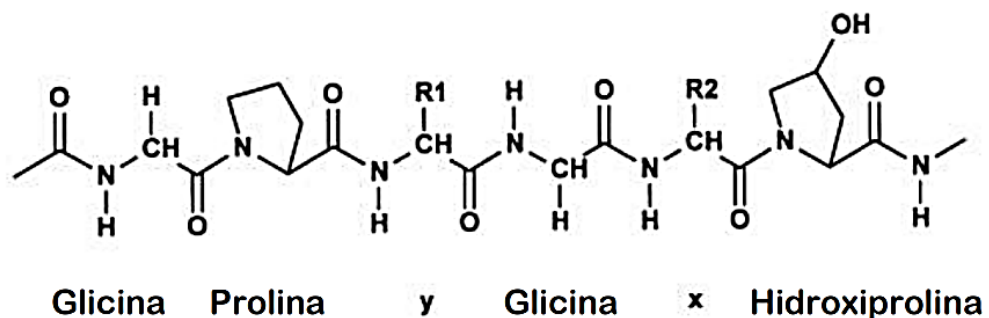


Figura 13: Cadeia de aminoácidos de uma estrutura de colágeno (MORAES, 2012; OAKENFULL, 1997)

A presença da Pro e da Hyp mantém o arranjo estável e resistente ao alongamento, assim, quanto maior a concentração desses aminoácidos, maior a resistência e o alongamento (ROSA, 2007). Essas características são conferidas pelo fato de que o átomo de nitrogênio da prolina está fixo em uma estrutura de anel, dificultando a rotação em seu entorno.

Além dos aminoácidos alguns carboidratos estão presentes na estrutura de colágeno, como a galactose e a glicose, ambas ligadas nos resíduos de hidroxilisina via grupo funcional do aminoácido hidroxil (PRESTES, 2012).

Os colágenos extraídos dos pés de aves, couro bovino, de rã, suínos ou tubarão se diferem quanto à composição de aminoácidos (OLIVEIRA, 2017). Dentre os colágenos extraídos desses animais, o tipo I é o mais utilizado. Ele apresenta alta similaridade entre diversas espécies, além da estabilidade conformacional e abundância na matriz extracelular (MOREIRA, 2014).

Em animais mais jovens as moléculas de colágeno apresentam-se mais sensíveis à desnaturação pela temperatura por apresentarem um menor número de ligações cruzadas. Com o passar do tempo essas ligações tornam-se mais estáveis, aumentando a rigidez da proteína. (ARGELINI, 2011).

3.6 Tipos de colágeno

As proteínas colagênicas são as mais abundantes e principais constituintes do tecido conjuntivo. Elas são formadas, em sua maioria, durante o desenvolvimento embrionário e tornam-se responsáveis pela formação e diferenciação dos tecidos, revestimento ósseo, cartilagem da pele e vasos sanguíneos (VISNARDI, 2007).

São encontrados na natureza 29 tipos genéticos de colágeno, sendo os mais abundantes no corpo humano os tipos fibrilares tipo (I, II e III) que formam fibras de colágeno com uma peridiocidade axial de 67 nm (OLIVEIRA, 2017) - (Tabela 2).

Tabela 2: Classes, tipos e localização de 14 diferentes tipos de colágenos presentes no corpo

Classe	Tipo	Localização
Formador de fibrilas	I	Presente predominantemente na derme; além dos tendões, ligaduras, órgãos e ossos, exceto em tecidos cartilaginosos.
Formador de fibrilas	II	Principal componente da cartilagem; presente no desenvolvimento da córnea, disco intervertebral e humor vítreo.
Formador de fibrilas	III	Encontrado nas paredes artéria e de órgãos ocos. Presente predominantemente nos vasos sanguíneos, pele e intestino.

(Continua)

Classe	Tipo	Localização
Associado aos formadores de fibrilas	IV	Presente na formação das bases da membrana basal.
Regulatório	V	Presente nos ossos, associado ao colágeno tipo I; são formadores da superfície celular, cabelos e placenta.
Associado aos formadores de fibrilas	VI	Localizado no tecido mais intersticial.
Formador de fibrilas	VII	Formador de fibrilas de ancoragem em junções epidérmicas dérmicas.
Formador de redes	VIII	Encontrado predominantemente no tecido endotélio e algumas células endoteliais.
Associado aos formadores de fibrilas	IX	Coexiste com o colágeno tipo II na cartilagem e humor vítreo.
Formador de redes	X	Encontrado na cartilagem hipertrófica.
Associado aos formadores de fibrilas	XIII	Localizado na transmembrana; compõe membranas basais como nidógeno e perlacan.
Associado aos formadores de fibrilas	XIV	Coexiste com o colágeno tipo I na pele e tendões.

As proporções relativas de cada tipo de colágeno variam de acordo com o tecido em que se encontra e com a função que exercem, sendo os formadores de fibrilas, os formadores de rede e os associados aos formadores de fibrila (CHAUNDRY, 1997). Os colágenos fibrilares, ou formadores de fibrilas (foco do presente trabalho) são, além de mais abundantes, os de maior interesse. Pela capacidade de se agregarem

paralelamente formando novas fibrilas, sua estrutura lhe confere maior resistência e estabilidade (LEE, 2001).

No colágeno o processo de desnaturação térmica proporciona o desenrolamento da estrutura de tripla hélice da proteína, podendo ser reversível ou irreversível (BRANDTS; HUNT, 1967). Um aquecimento severo leva à transformação irreversível da estrutura helicoidal do colágeno (BRANDTS, 1969). Se for brando, resulta em um desdobramento no interior da proteína, enquanto um aquecimento mais severo leva a transformação irreversível da estrutura nativa (MORAWETZ, 1972).

3.7 Colágeno hidrolisado e Gelatina

A proteína de colágeno pode se apresentar de diversas formas, de acordo com suas características físicas, químicas, metodologia de extração, sequência de aminoácidos (GORGIEVA, 2011) e solubilidade. Dentre os tipos comumente obtidos de colágeno (hidrolisado e gelatina). O colágeno hidrolisado é solúvel em salmoura ou em água deionizada; não possui capacidade de geleificação, enquanto o parcialmente hidrolisado, é solúvel em água a elevadas temperaturas e possui capacidade de geleificação (PRESTES, 2013).

O colágeno hidrolisado é uma proteína natural derivada do colágeno nativo, encontrada na pele e nos ossos (PRESTES, 2013; LÓPEZ, 2019). A gelatina é uma proteína completamente desnaturada (SILVA, 2012) obtida a partir da hidrólise a elevadas temperaturas, de uma matéria-prima animal, a temperaturas em torno de 65 °C e em pH ácido ou alcalino.

Na indústria o colágeno hidrolisado é obtido por hidrólise química ou enzimática, sob condições controladas (PRESTES, 2012; KEMPRA, 2014). Enquanto a gelatina é obtida a partir da hidrólise parcial ácida ou alcalina, a elevadas temperaturas e pode ser usada apenas como um agente emulsificante (SILVA, 2012).

Neste processo há um arranjo ordenado-desordenado das estruturas terciárias da proteína (GORGIEVA, 2011). Com o resfriamento, estas se reorganizam e ligam-se com as moléculas de água através de ligações de hidrogênio, formando uma estrutura estável de colágeno parcialmente hidrolisado (gelatina) – (Figura 14) (NASCIMENTO, 2016).

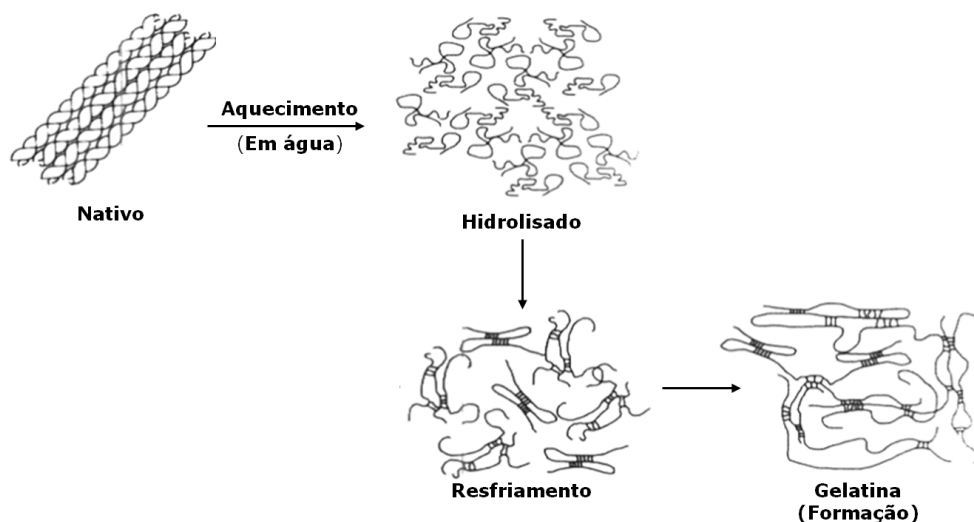


Figura 14: Representação esquemática da extração da gelatina de matéria prima animal - (NASCIMENTO, 2016).

Ao estabilizar-se à temperatura ambiente a tripla hélice é recuperada parcialmente e assim forma um gel amorfo de cadeias enroladas randomicamente estabilizadas por ligações de hidrogênio. Essas ligações são formadas entre o gel e o solvente ou entre a amina da glicina e a carbonila da prolina. (RODRIGUES, 2009; GORGIEVA, 2011).

As condições de extração da gelatina levam ao rompimento das ligações cruzadas e das interações de hidrogênio, fundamentais para a estabilidade da estrutura do colágeno (PRESTES, 2013). Consequentemente, as gelatinas apresentam uma maior concentração de moléculas de menor massa molecular, o que lhe confere menor viscosidade e resistência e possui capacidade de geleificação. Este produto é de grande aplicação na indústria de alimentos, agindo como agente emulsificante (GORGIEVA, 2011).

A principal propriedade da gelatina é a sua capacidade de formar soluções para produzir géis com estabilidade a temperaturas inferiores a

40 °C (GORGIEVA, 2011; SILVA, 2012). Enquanto os colágenos hidrolisados apresentam baixa massa molar, melhor absorção e biodegradabilidade (GORGIEVA, 2011), alto nível de aa tipos glicina e prolina (SILVA, 2012).

Pela elevada umidade e distribuição cruzada das interações de hidrogênio, seu comprimento reduz-se para 1/3 a 1/4 do seu tamanho real e adquire maior elasticidade quando comparado ao colágeno bruto (CHAUNDY et al., 1997; NEKLYUDOV, 2003). Sua fibra polimérica é biodegradável e com excelente biocompatibilidade, adesividade e adesão celular (LIU, et al., 2009).

3.8 Metodologias de extração de fontes clássicas e alternativas de colágeno

O interesse das indústrias de alimentos, estética e até mesmo na medicina levou a uma crescente valorização e necessidade de se efetuar a extração do colágeno. No Brasil, a grande quantidade de produção de carnes de mamíferos leva, como consequência, a uma produção de quantidade considerável de subprodutos, peles, ossos, tendões de bovinos e suínos. Essas, utilizadas como fontes de colágeno (PRESTES, 2013; LIU et al. 2009). Entretanto, os surtos de zoonoses como: encefalopatia espongiforme bovina (Do inglês *Bovine spongiform encephalopathy*, BSE), Encefalopatia espongiforme transmissível (Do inglês *Transmissible spongiform encephalopathy*, TSE) e febre aftosa (FA), levou à busca de fontes alternativas mais seguras para obtenção da proteína (LIN, 2006; ZHANG, 2007).

Animais aquáticos, como os peixes e rãs, apresentam-se como uma potencial alternativo de fonte de colágeno, uma vez que estão disponíveis, há baixo risco de transmissão de doenças, baixa toxicidade, rendimentos elevados, quando comparados aos colágenos de animais terrestres. Além disso, poucos trabalhos são realizados frente à utilização dos resíduos da ranicultura (SENARATNE et al., 2006; NERI, 2013).

Nagai e Suzuki (2000) realizaram um trabalho investigativo de extração e caracterização do colágeno a partir de ossos de peixe. O processo de extração foi realizado a baixas temperaturas e os ossos pré tratados em NaOH e CH₃COOH para remoção de proteínas não colágenas e compostos insolúveis, respectivamente. O rendimento foi de 51,4% a partir da pele do peixe Robalo japonês (*Lateolabrax japonicus*).

Muyonga, Cole e Duodu (2004) realizaram em seu trabalho a extração em diferentes temperaturas (50, 60, 70 e 95 °C) do colágeno tipo I de peles e ossos de peixe (*Lates niloticus*) jovens e adultos. O teor de cinzas do colágeno a partir das peles variou de 0,5 a 1,7 % e dos ossos, 4,4 a 11,2 %. As peles de peixes jovens e adultos apresentaram um rendimento de 12,5 % e 16 %.

Huang e colaboradores (2011) realizaram um estudo de caracterização e isolamento do colágeno a partir da pele do peixe-balão-de-espinhos-longos (*Diodon holocanthus*). O produto apresentou-se solúvel em ácido e pepsina com rendimento de 4 % e 19,5 %, respectivamente, com base na massa da pele seca.

Alfato e colaboradores (2012) extraíram colágeno a partir do couro de Tilápia (*Oreochromis urolepis hornorum*). O colágeno obtido a partir dessa fonte alternativa foi caracterizado como colágeno tipo I, contendo 21,67 % de Pro e Hydp. Neste processo de extração, o autor lavou os couros com solução de NaCl e NaOH. Posteriormente, o couro foi tratado com ácido sulfúrico (H₂SO₄) 0,3% m/v e lavado com água corrente; submetido a um segundo tratamento em ácido cítrico (C₆H₈O₇) 0,7% m/v. A extração foi realizada em Bioreator BIOSTAT B utilizando água deionizada por 6 h, a 40 °C. O material foi filtrado e caracterizado.

Veeruraj e colaboradores (2013) realizaram o isolamento e caracterização do colágeno extraído do peixe Enguia (*Electrophorus electricus*). O produto extraído em ácido, com base na massa da pele seca, apresentou rendimento de 80 %, com estabilidade térmica de 39 °C, enquanto o extraído em pepsina apresentou rendimento de 7,1 % e estabilidade térmica de 35 °C. O estudo sugere que o colágeno extraído

da enguia poderia ser utilizado como um potencial substituinte do colágeno tipo I de mamíferos.

Neri (2013) realizou um estudo de extração e caracterização do colágeno a partir das escamas de Peixe Cioba (*Lutjanus analis*). O colágeno extraído foi caracterizado como colágeno tipo I e apresentou um rendimento de 3,85 % e 6,15 % (peso seco) extraídos em ácido solúvel e em pepsina solúvel, respectivamente. A temperatura máxima de transição foi de 76 °C em ácido e de 77 °C em pepsina.

Bazaz e colaboradores (2013) produziram uma pomada contendo colágeno de sapo (*R. Ridibunda*) liofilizado para avaliar os efeitos da pele de rã liofilizada na cicatrização de feridas em ratos. O estudo mostra efeitos positivos na cicatrização da ferida, redução da inflamação, aumento na proliferação de fibroblastos e quantidade de colágeno, promovendo rápido fechamento da ferida. Devido à presença de lipídeos e colágeno tipo I.

O estudo de Pal e colaboradores (2015) consistia no comparativo de formação de fibrilas de colágeno solúvel em ácido e em pepsina de duas espécies de carpa, produzidas pela aquicultura de água doce: Catla (*Catla catla*) e Rohu (*Labeo rohita*). Os colágenos extraídos foram caracterizados como colágeno tipo I de alta qualidade, com base no padrão eletrofotográfico.

Veeruraj e colaboradores (2015) realizaram o isolamento e caracterização do colágeno a partir da pele de lulas (*Doryteuthis singhalensis*). O produto foi caracterizado como colágeno tipo I e os resíduos da pele apresentaram-se como potenciais fontes de colágeno. Para ácidos e pepsina, a extração apresentou rendimento de 56,80 % e 24,60 %, respectivamente.

Yousefi e colaboradores (2017) realizaram a extração e caracterização de colágeno dos pés de codornas. O produto apresentou alta estabilidade térmica podendo ser considerados como uma boa alternativa de substituição ao colágeno derivado de mamíferos utilizados em biomateriais, alimento, produtos farmacêuticos, etc. Além disso,

apresentou-se solúvel em ácido e pepsina, com temperatura de desnaturação em ácido e em pepsina foi de 39,6 e 38,33 °C, respectivamente.

Normah e Maidzatul (2018) realizaram um estudo onde avaliaram as características físico-químicas do colágeno de resíduos do corvina em função do tempo (3 e 5 dias). A extração produziu rendimentos de 2,74 e 3,35% para 3 e 5 dias, respectivamente.

Park e Jo (2019) realizaram um trabalho de otimização do método de obtenção do colágeno tipo I por hidrólise de pele de peixe, investigando o efeito da temperatura e pressão elevados. Concluíram que a temperatura de 210 °C e pressão de 2100 kPa aumentam os níveis de grupos amino livres e colágeno de baixo peso molecular. Os hidrolisados resultantes foram fracionados por membranas de ultrafiltração de diferentes pesos moleculares e o rendimento variou de acordo com a membrana utilizada, variando de 1,3 % a 56,9 %.

Li e colaboradores (2020) realizou a extração de colágeno solúvel em pepsina a partir da pele pepino do mar (*Holothuria cinerascens*) com foco na aplicação em cosméticos. A reação apresentou um rendimento por diferença de massa de 72,2 % e de proteína bruta, 10,3 %.

Os trabalhos a respeito do colágeno de rã são recentes. Um dos primeiros estudos foi de Kumar (2002). O autor desenvolveu um trabalho de aplicação do colágeno de pele de rã (*Rana tigerina*). Ele avaliou o comportamento, morfologia, fisiologia dos queratinócitos e fibroblastos (células envolvidas no reparo de feridas) reconstituídos com o uso de colágeno do animal. Concluiu que o colágeno forma um bom substrato para cultura de queratinócitos e fibroblastos.

Falcão e colaboradores (2002) realizaram um estudo preliminar do uso da pele de *Rana Catesbeiana* como curativo biológico. As peles utilizadas como curativos foram preservadas em solução de NaCl e glicerol à 4 °C. O curativo foi testado em cães com feridas cutâneas e apresentou resultados não efetivos.

Wang (2011) extraiu o colágeno da rã (*Rana catesbeiana*). O processo de extração foi realizado em pepsina solúvel e apresentou um rendimento de 16,4 %. As caracterizações realizadas permitiram concluir que o colágeno extraído é do tipo I.

Bazaz e colaboradores (2013) realizaram o primeiro estudo que investigou a eficácia de cura de pele de rã-touro processada em feridas cutâneas de espessura total de ratos. O estudo foi feito em feridas de queimadura e mostra efeitos positivos na cicatrização da ferida, redução da inflamação, aumento na proliferação de fibroblastos e quantidade de colágeno, promovendo rápido fechamento da ferida.

Souza, (2015) realizou um experimento aplicando o colágeno extraído do couro de rã-touro em membranas de nanocelulose, a fim de desenvolver um biopolímero com propriedades cicatrizantes. O biopolímero apresentou propriedades cicatrizantes e de alta biocompatibilidade com o tecido humano.

Zhang e Duan (2017) realizaram um estudo de extração e caracterização do colágeno solubilizado em ácido e em pepsina da pele de rã (*Rana nigromaculata*). O produto foi caracterizado como colágeno tipo I; apresentando rendimento 1,83 % e 19,59 %, em ácido e pepsina, respectivamente. A proporção da hidroxiprolina apresentou concentração superior a encontradas em carpas, mas inferior a de bezerros, 8,37 %, com temperatura de desnaturação 31,5 °C. Essas características indicam que o colágeno do couro de rã é um potencial substituinte ao colágeno de mamíferos para aplicação industrial, uma vez que a concentração de hidroxiprolina apresentou-se superior ao dos bezerros.

Karnjanapratum e colaboradores (2017) avaliaram a influência da temperatura no processo de extração do colágeno de rã (*Rana tigerina*). Para isso, a temperatura de extração foi variada na faixa de 45 a 75 °C. O rendimento total variou de 7,14 a 15,40 % com a variação da temperatura.

Zhao e colaboradores (2018) realizaram a extração de colágeno hidrolisado a partir da pele de rã (*Rana chensinensis*) com pepsina em

condições ácidas. O produto exibiu um pH ácido e Td 33,5 °C. O rendimento foi de 15,1% obtido a partir da diferença de massa.

Tümerkan (2019) extraiu o colágeno a partir da pele de diferentes animais para efeitos de comparação. Dentre eles, a rã (*Rana esculanta*). O processo consistiu em um pré tratamento com soluções salinas e ácidas, seguidas do processo de extração. A extração foi realizada a uma temperatura de 45 °C por 12h. A gelatina apresentou um teor de proteínas de 77,8 % .

3.9 Rã – touro

A rã é um anfíbio de pele nua, vertebrado, ectotérmico, ovíparo e com diferenciação sexual bem marcada. Os machos apresentam tímpano com diâmetro maior que o olho, bordas escurecidas e papo amarelo, características não apresentadas nas fêmeas (MERCANTE, 2014). A rã detém de uma superfície revestida por uma pele fina, lisa, úmida e flexível, normalmente de cor verde, mas que pode variar entre castanho, amarelo, albino ou azul (FERREIRA et al., 2006) – Figura 15.



Figura 15: Rã-touro

O animal é caracterizado pela elevada rusticidade – facilidade de manejo, resistência às variações climáticas, prolificidade, precocidade – crescimento rápido e qualidades nutricionais e sabor delicado da carne (SEIXAS FILHO, PEREIRA e MELLO, 2017, MELLO, 2006).

A rã possui um ciclo de vida complexo, dividido em dois estágios: aquático (girinos) e terrestre - Figura 16. O estágio aquático a rã tem a

forma de girino, um ser composto de cartilagem e que sofre um processo contínuo de mudanças morfofisiológicas. Quando é um imago, no estágio terrestre, o animal possui um esqueleto ósseo, algumas estruturas cartilaginosas, sobretudo o crânio. Essa estrutura se desenvolve até que o animal chegue a fase adulta (SEIXAS FILHO, PEREIRA e MELLO, 2017).).

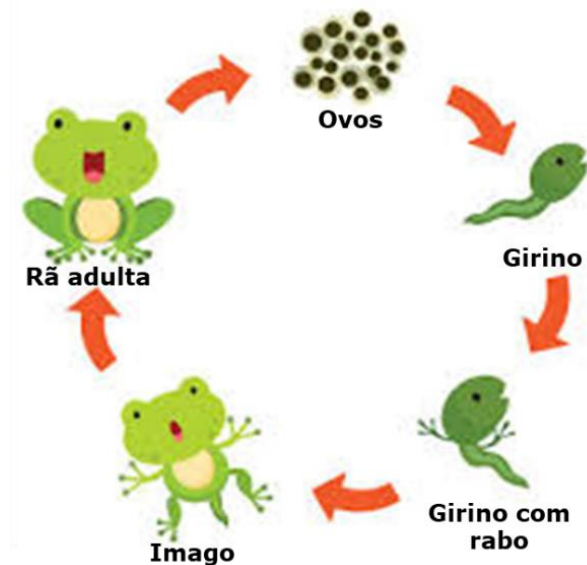


Figura 16: Ciclo de vida da rã touro

Comparada às demais espécies, na fase adulta, a rã touro (*Lithobates catesbeianus*), possui um dos maiores tamanhos. Os girinos podem passar de 15 cm de comprimento e os adultos podem medir mais que 43 cm de comprimento e cerca de 2,50 Kg (FERREIRA et al., 2006). Ela é nativa da América do Norte e chegou ao Brasil em 1930, hoje pode ser encontrada em mais de 41 países utilizada para fins comerciais (AYRES, 2015).

O corpo da rã é coberto por um tecido fino (pele), constituinte de 11 % da massa viva do animal. Ele é responsável pela absorção de água e respiração cutânea do animal (FERREIRA et al., 2006). Esse tecido apresenta um nível de diversidade bioquímica com excelente sistema de defesa química (FERREIRA et al., 2006; BAZAZ, 2013).

A carne da rã-touro possui uma composição nutricional diferenciada quando comparada a outros alimentos de origem animal. Ela

apresenta alto teor de proteínas, baixo teor de lipídeos e alta porcentagem de ácidos graxos poliinsaturados (AYRES, 2015).

A sua reprodução acontece no meio aquático, preferencialmente no habitat pantanoso, como brejo com vegetação ou rio de água calma (SEIXAS FILHO, PEREIRA e MELLO, 2017).

3.10 Colágeno de Rã

O muco secretado pelas glândulas epidérmicas da rã apresenta grande variedade de substâncias químicas de interesse industrial, como colágeno e queratina (FERREIRA et al., 2006; BAZAZ, 2013).

A composição química da pele da rã, estrutura lipídica (fosfolipídios, colesterol, triglicerídeos, diglicerídeos e ácidos graxos), presença de componentes bioativos das secreções cutâneas, facilidade em formar gel (KUMAR, 2002; BAZAZ, 2013) e conteúdo proteico– Tabela 3, leva-o a se tornar um potencial substituto de fonte de colágeno animal.

Dentre os aminoácidos conhecidos como essenciais, ou seja, não produzidos pelo organismo e são obtidos pela alimentação) (LEHNINGER, 2000) presentes na Tabela 3, o colágeno de Rã apresenta uma maior quantidade quando comparado ao colágeno de Novilho e de Tilápia.

Tabela 3: Composição do (resultados expressos em g/1000 g de proteína) (Adaptado de LI et al. 2003¹; Gudmundsson, 1997²)

Aminoácidos	Rã- touro ¹	Novilho ¹	Tilápia ²
Glicina	300	330	240
Hidroxiprolina	54	94	103,3
Prolina	113	121	150,1
Leucina	27	23	25,6
Isoleucina	11	11	10,7
Metionina	5	6	12,3
Fenilalanina	18	3	19,7
Tirosina	5	3	7,2
Valina	25	21	13,2
Lisina	33	26	35,4
Arginina	56	50	87,8

Histidina	6	5	10,1
Hidroxilisina	11	7	-
(Contiua)			
Aminoácidos	Rã- touro¹	Novilho¹	Tilápia ²
Ácido aspártico	53	45	52,9
Ácido glutâmico	80	75	88,5
Alanina	119	119	92,7
Treonina	23	18	25,5
Serina	53	39	31,2

Um dos primeiros trabalhos de extração de colágeno a partir do couro de rã-touro foi executado por Li e colaboradores (2004), no qual o produto pode ser caracterizado como colágeno de tipo I. Poucos foram os trabalhos realizados a respeito do colágeno dessa origem animal, mas suas descobertas foram promissoras – Figura 17.

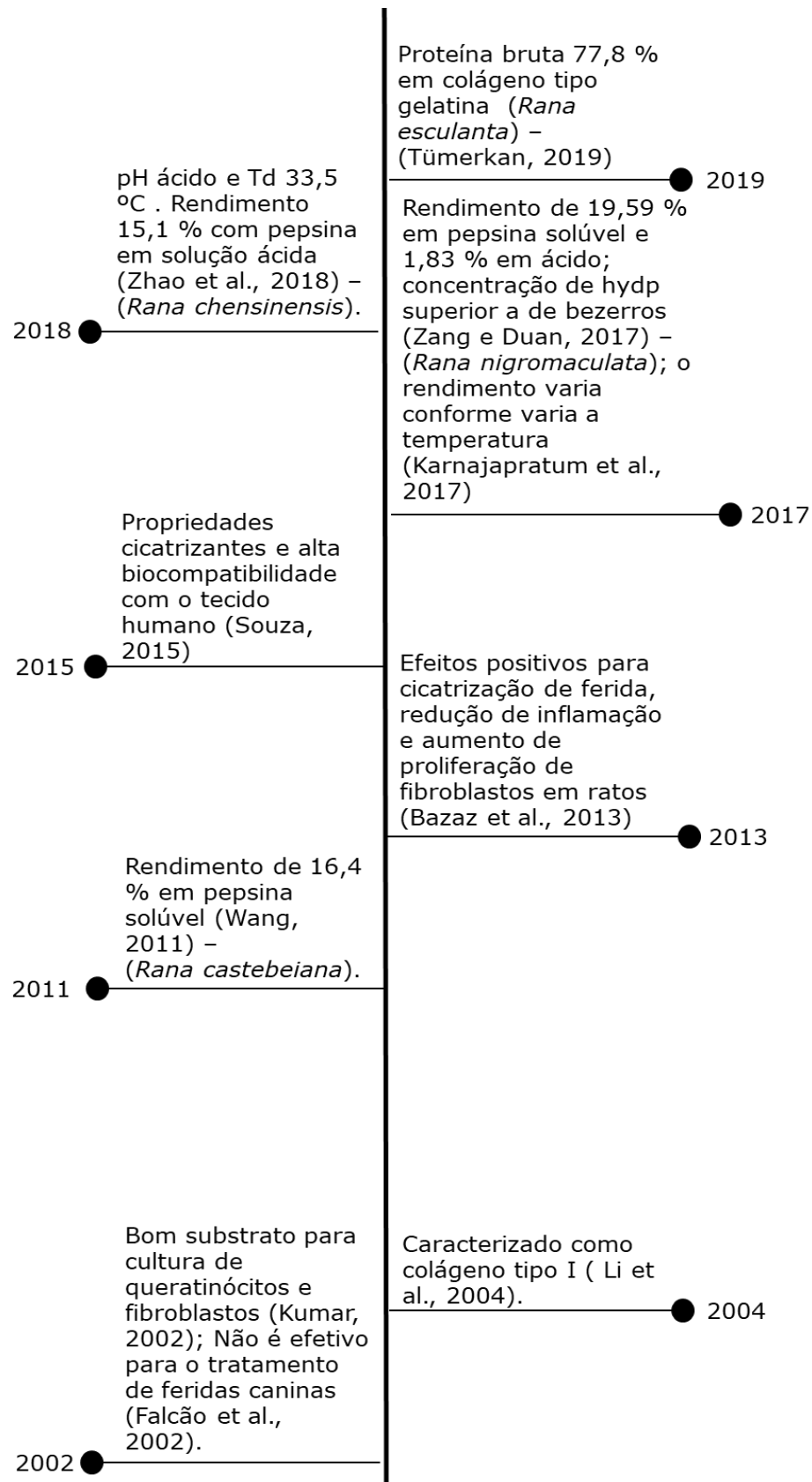


Figura 17: Linha do tempo dos trabalhos realizados a respeito do colágeo de rã e suas respectivas descobertas

Os resultados obtidos nos estudos realizados a respeito do colágeno de rã caracterizam-o como potencial fonte alternativa para diversas aplicações. Ele apresenta biocompatibilidade com o tecido humano, alta disponibilidade, alta solubilidade e capacidade de absorção e custo-benefício (SOUZA, 2015; LI, 2020), uma vez que, nada é feito com os resíduos da indústria de carne de rã.

3.11 Metodologias de extração

O colágeno pode ser extraído por diferentes métodos de extração ou uma combinação desses (sal neutro ou alcalino, ácido acético, ácido propiônico e enzimático), dependendo do tipo e da matéria prima (OLIVEIRA, 2017).

A maioria dos processos, a fim aumentar a eficácia e ganho de maior rendimento final, inicia-se com um pré-tratamento. O procedimento objetiva a remoção de gorduras, cálcio (OLIVEIRA, 2017; FERRARO, 2017), proteínas não colagênicas, compostos solúveis e insolúveis.

As extrações por solução ácida e alcalina requer temperatura mais elevadas (até 75 °C) e longos períodos. Enquanto as extrações ácidas e enzimáticas ocorrem em torno de 192 horas. Neste tipo de reação utiliza-se NaOH, CH₃COOH, pepsina e NaCl como reagentes. O processo final de purificação pode ser realizado através de precipitação salina, métodos cromatográficos, diálise (OLIVEIRA, 2017) ou filtração.

A extração realizada por Li e colaboradores (2004) com uma mistura de ácido acético (0,5 M) e pepsina, gerou um rendimento de colágeno solúvel em pepsina de 12,60%, com base no peso. O método enzimático realizado por Wang (2011) possibilitou obter 16,40% de colágeno da trompa de falótipo de rã-touro. Enquanto o trabalho realizado por Souza (2015) observou que a quantidade de colágeno extraída em ácido acético correspondia a 1,72 % de colágeno de pele de rã-touro, cerca de 80% das proteínas totais.

3.12 Aplicações do colágeno

O colágeno tipo I é o biopolímero mais abundante do corpo e pela sua alta biocompatibilidade, propriedades biodegradáveis, capacidade de promover crescimento celular, estabilidade, porosidade e ampla capacidade de adesão celular, (MOREIRA, 2014; NAGAI, 2013), esta proteína é utilizada em diversas áreas: farmacêutica, cultura de células, alimentos, cosméticos, produção de gelatina fotográfica, indústria de couro, síntese de filmes e engenharia genética e de tecidos (LIU, 2003).

Na engenharia de tecidos, utilizada na produção de biomateriais como membranas esponjosas e géis que auxiliam na cicatrização de queimaduras (OLIVEIRA, 2017), uma vez que orienta e estimula a formação de tecidos e confere a eles resistência mecânica (NAGAI, 2000).

Na medicina, o colágeno é utilizado no tratamento de doenças genéticas associada à deficiência de colágeno como, por exemplo, a osteogênese imperfeita, conhecida popularmente como “doença dos ossos quebradiços” (OLIVEIRA, 2017), e no tratamento de doenças como hipertensão arterial, incontinência urinária e doenças angiogênicas (ZHANG et al., 2016).

Na área farmacêutica, é utilizado como suporte de enzimas, produção de compostos biologicamente ativos e carreadores de drogas (ZHANG et al., 2016). Associado a outros compostos, como quitosana, gelatina, alginatos e oligossacarídeos aumenta sua resistência mecânica, podendo ser aplicado na produção de suturas, agentes hemostáticos, regeneração tecidual (TONHI, 2002; RODRIGUEZ, 2009), cirurgia plástica, oxigenador de membrana, contraceptivos, matrizes biodegradáveis (SOUZA, 2015), implantes, bandagem da córnea e lentes de contato (FERREIRA et al., 2012).

Na indústria de alimentos é utilizada na suplementação. Estudos comprovam que a ingestão de colágeno através de alimentos ou suplementos, leva a positivos efeitos no auxílio do crescimento de unhas, cabelos (RODRIGUES, 2009), na síntese e metabolismo celular de novos tecidos e na composição de ossos, dentina, tendões, cápsulas de órgãos,

córnea e na derme (OLIVEIRA, 2017), conferindo a eles propriedades mecânicas e bioquímicas.

O colágeno começou a ser aplicado em suplementos alimentares e em produtos alimentícios, como: chás, sucos, embutidos, iogurtes e gelatinas com a finalidade de melhorar a nutrição, estabilidade, estabilidade e consistência de alguns produtos (NAGAI, 1999). Sua ingestão tem como principal objetivo melhorar a elasticidade e firmeza da pele, oriunda das mudanças graduais dos tecidos e a degradação das moléculas no início da fase adulta (SILVA, 2012). Após sua ingestão oral, com 12 horas de jejum, peptídeos de colágeno são detectados no sangue, na forma de gelatina (OLIVEIRA, 2017).

Apesar da sua aplicabilidade em diversas áreas, há algumas limitações, como por exemplo o custo de produção da proteína e estabilidade térmica do gel extraído (PATI, 2010), sendo a Td de peixes menor que o de mamíferos (NAGAI, 2000).

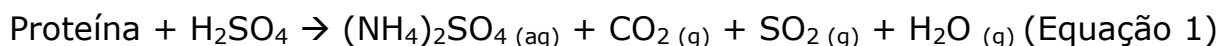
3.13 Determinação da qualidade do colágeno – Método Kejedahl

Para a determinação da concentração de proteínas totais pode-se utilizar dois métodos diferentes, envolvendo análises instrumentais, usando espectrofotômetro UV-Vis, ou por via úmida, pelo Método de *Kejedahl* (INSTITUTO ADOLFO LUTZ, 1985).

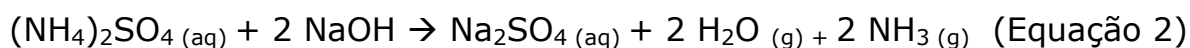
O Método de *Kjeldahl* pode ser aplicado em todo tipo de alimento ou substância composta por proteínas. Apresenta baixo custo, simplicidade e pode ser modificado pela alteração do catalisador, sendo o método oficial para a determinação de proteínas em alimentos. Apesar disso, mensura-se a quantidade de nitrogênio orgânico total, não exclusivamente, o presente nas proteínas (INSTITUTO ADOLFO LUTZ, 1985).

Esse método é realizado em três etapas: digestão, destilação e titulação. No processo de digestão a matéria orgânica (proteína) é mineralizada, levando ao desprendimento de gás carbônico (CO₂), na

presença de ácido sulfúrico concentrado, sob aquecimento a 422 °C, contendo uma mistura catalítica de sulfato de cobre (II) e de sulfato de sódio para acelerar a digestão da amostra. As equações a seguir correspondem à primeira etapa do método de *Kjeldahl*, no qual todos os grupamentos contendo átomos de nitrogênio são convertidos em amônia, que reage com ácido sulfúrico concentrado (H_2SO_4 (conc.)), formando sulfato de amônio (INSTITUTO ADOLFO LUTZ, 1985)- Eq 1:



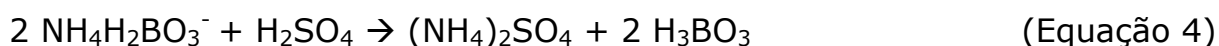
O tratamento do sulfato de amônio com excesso de hidróxido de sódio, leva a liberação de amônia - Eq 2:



No processo de destilação, a amônia gerada é borbulhada em uma solução contendo ácido bórico, que conduz à formação de borato de amônio. A essa solução é empregado um indicador misto para verificar a mudança de pH da solução conforme se processava a reação da amônia com o ácido bórico. A etapa de destilação é suspensa quando se verifica o término do borbulhamento sob a solução iônica de ácido bórico (H_3BO_3^-) (INSTITUTO ADOLFO LUTZ, 1985) - Eq 3:



O último passo é o proceder com a titulação ácida para quantificação do amônio- Eq 4:



4. MATERIAIS E MÉTODOS

Todas as partes de rã-touro utilizadas nesse trabalho foram cedidas pela empresa Frigorã e embaladas em sacos lacrados e evacuados.

As amostras utilizadas são resíduos da empresa destinados, atualmente, à compostagem.

4.1 Reagentes

Para a execução das metodologias de limpeza, extração e caracterização do colágeno foram utilizados os seguintes reagentes e solventes comerciais:

- Ácido acético glacial (CH_3COOH) (EXÔDO);
- Ácido bórico 3% m/v (Neon)
- Ácido clorídrico (HCl) ($0,10 \text{ mol.L}^{-1}$) (Neon);
- Ácido sulfúrico (H_2SO_4) P.A. (Neon);
- Cloreto de sódio (NaCl) (Synth);
- Hidróxido de sódio (NaOH) (Neon);
- Hidróxido de sódio (NaOH) 40% m/v;
- Mistura catalítica de sulfato de sódio anidro e sulfato de cobre (2:1)
- Solução indicadora mista (vermelho de metila e verde de bromocresol).

4.2 Procedimentos

A extração do colágeno a partir das peles de rã-touro ocorreu por reações de extração envolvendo 5 e 10 peles. A massa média da unidade das peles variou de 25 g a 33 g. Além das peles, foi utilizada uma metodologia de extração do colágeno a partir das patas. Para isso, utilizou-se um lote de patas que variou a massa de 260 g a 330 g.

A fim de obter a metodologia mais eficiente para a extração de colágeno em gel, alguns parâmetros foram avaliados e variados. Dentre essas variações encontra-se (i) o tempo de imersão em solução, (ii) a concentração das soluções e (iii) a temperatura ambiente, conforme descrito na tabela 4.

Avaliou-se os materiais obtidos visualmente e o melhor resultado foi o da extração 8.0 M (relatado nos ítems “Preparação das peles e patas” e “Extração do colágeno”), devido ao seu aspecto de gel, cor cinza claro e homogeneidade após filtração – Figura 18 b. Ao final do processo de extração, antes de ser filtrado, as peles apresentaram-se totalmente trituradas - Figura 18 a) o que levou ao gel apresentar uma coloração cinza escuro antes da etapa de filtração.

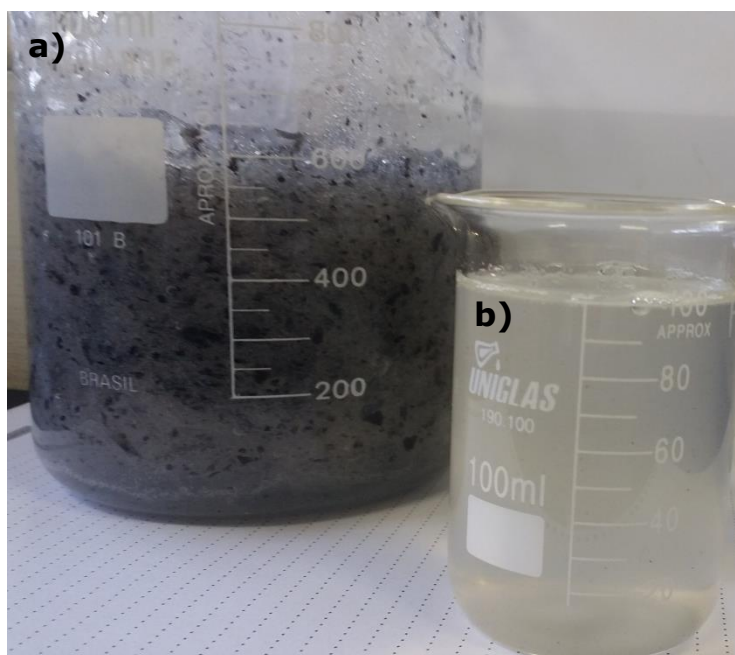


Figura 18: Amostra de colágeno obtida na extração 8.0 a) não filtrado; b) filtrado

A partir deste resultado, propôs-se que a metodologia 8.0 fosse utilizada como base e replicatas fossem produzidas. As amostras foram agrupadas e nomeadas como: A (8.1, 8.2, 8.3, 8.4), B (8.5, 8.6, 8.7, 9.1, 9.2), C (9.31, 9.32, 9.41, 9.42 e 9.5) e D (8.7P, 8.8P, 9.0P, 9.1P).

As variações envolvendo as amostras das replicatas dos grupos A, B e C foram: temperatura ambiente e modelo de agitador mecânico. As amostras do grupo D são referentes às patas e foram submetidas aos mesmos processos e condições que as amostras dos demais grupos.

O controle da temperatura ambiente foi realizado por meio de um equipamento de ar condicionado. Mas notou-se que o método de controle

não apresentou-se suficiente, uma vez que, a temperatura apresentou variações em função da variação da temperatura externa.

Para obtenção de melhores resultados e controle da rotação o modelo de agitador mecânico foi alterado. Inicialmente foi utilizado o agitador mecânico modelo Fisatom (modelo a) – Figura 19 a, ao qual não era possível controlar a rotação. Este foi então substituído por um agitador mecânico IKA (modelo b) – Figura 19 b. Um modelo digital e atual, ao qual era possível controlar a rotação da amostra.

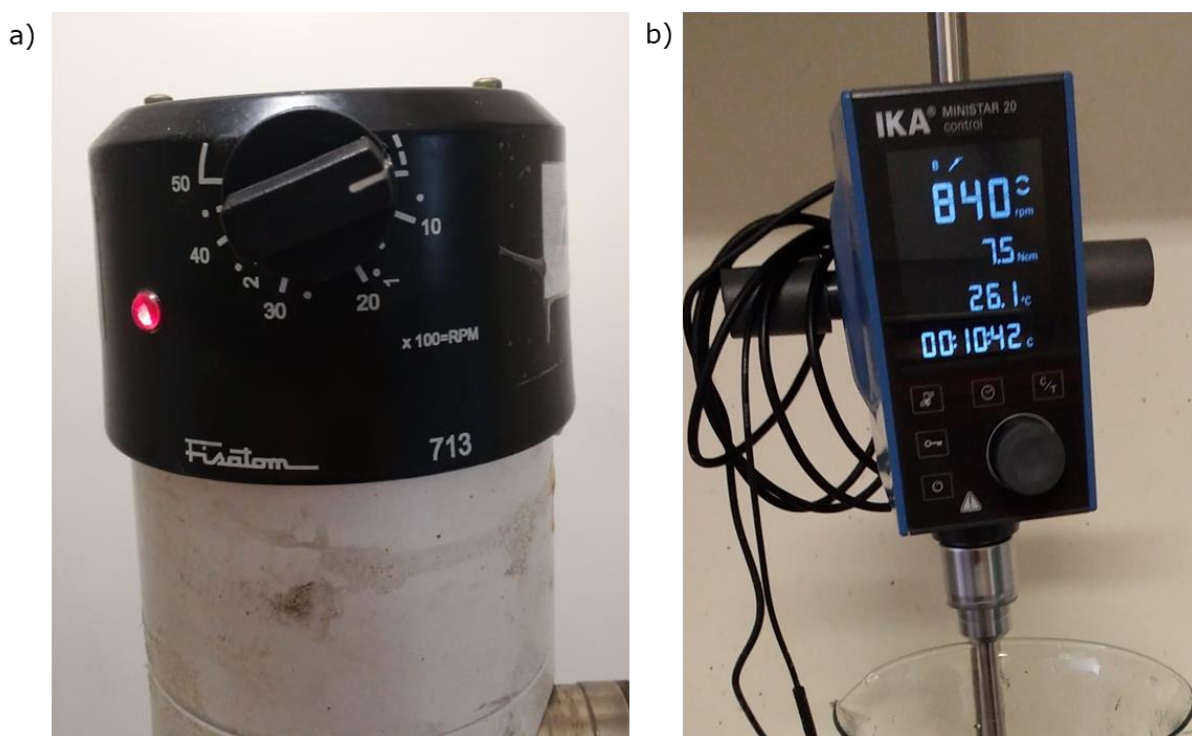


Figura 19: Fotografia dos agitadores mecânicos a) modelo Fisatom e b) modelo IKA

A troca de agitadores nos possibilitou obter produtos diferentes entre si em função do controle de rotação durante o processo de extração.

Tabela 4: Processos de extração de colágeno, suas respectivas modificações e observações realizadas nos anos de 2017 a 2019

Extração (Cod.)	Data	Modificação	Observações na amostra
1 TCC	16/05/17	Tempo imerso nas soluções de NaCl e temperatura nos processos de preparação e extração. Etapa de secagem	Solução translúcida
2 TCC	17/05/17	Tempo imerso nas soluções de NaCl e temperatura nos processos de preparação e extração. Etapa de secagem	Solução translúcida
3 TCC	25/05/17	Tempo imerso nas soluções de NaCl e temperatura nos processos de preparação e extração. Etapa de secagem	Presença de fungos na solução final
4 TCC	09/09/17	Temperatura nos processos de preparação e extração. Etapa de secagem. Armazenamento	Amostra em gel com excesso de água
5 TCC	09/09/17	Replicata da extração 4 TCC	Presença de fungos na solução final
6 TCC	19/09/17	Tempo imerso em solução de NaOH. Temperatura nos processos de preparação e extração.	Presença de fungos na solução final
7 TCC	19/9/17	Replicata da extração 4 TCC com couro hidratado e recém retirado	Presença de fungos na solução final; solução amarelada

(Continua)

Extração (Cod.)	Data	Modificação	Observações na amostra
8 TCC	19/09/17	Replicata da extração 4 TCC com couro hidratado e recém retirado	Presença de fungos na solução final; solução amarelada
9 TCC	3/10/17	Replicata da extração 4 TCC - Processo de esterelização das peles anterior ao processo de extração	Solução escura
10 TCC	3/10/17	Replicata da extração 4 TCC - Processo de esterelização das peles anterior ao processo de extração	Solução escura
11 TCC	16/10/17	Replicata da extração 4 TCC - Processo de esterelização das peles e dos frascos anterior ao processo de extração	Solução escura
12 TCC	17/10/17	Concentração dos reagentes	Solução escura
13 TCC	18/10/17	Couros não esterelizados	Produto com aspecto gelatinoso
14 TCC	23/10/17	Replicata da extração 4 TCC - Processo de esterelização das peles após embaladas e dos frascos	Solução amarelada
16 TCC	13/11/17	Couros não esterelizados, congelados 24h antes da extração	Produto com aspecto gelatinoso, mas escuro
17 TCC	14/11/17	Couros não esterelizados, congelados 24h antes da extração	Produto com aspecto gelatinoso, mas escuro

(Continua)

Extração (Cod.)	Data	Modificação	Observações na amostra
15 TCC	30/10/17	Couros não esterelizados	Solução amarelada
1M	10/10/18	Quantidade de reagente no processo de preparação das peles; Peles cortadas ao meio; Etapa de secagem	Presença de um pó na solução filtrada
2M	17/10/18	Imersão em ácido acético sob refrigeração; Peles cortadas ao meio; Etapa de secagem	Formação de um gel com a aliquota não destinada à secagem
3M	18/10/18	Imersão em ácido acético sob refrigeração no ar condicionado; Peles cortadas ao meio; Etapa de secagem	Mal cheiro - Descartada
4M	24/10/18	Imersão em ácido acético sob refrigeração em ar condicionado; Peles cortadas ao meio; Secagem em temperatura ambiente	Amostra líquida
5M	25/10/18	Imersão em ácido acético sob refrigeração; Peles cortadas ao meio; Processo de extração 20h	Amostra líquida e escura
6M	31/10/18	Imersão em ácido acético sob refrigeração; Peles cortadas ao meio; Processo de extração 13h	Amostra líquida com presença de um precipitado branco
7M	08/11/18	48h em ácido acético sob refrigeração	Presença de mofo
8.0 M	21/11/18	Imersão em ácido acético sob refrigeração; Peles cortadas; secagem à temperatura ambiente - Agitador a	Formação de um gel cinza

(Continua)

Extração (Cod.)	Data	Modificação	Observações na amostra
Grupo A (8.1; 8.2; 8.3 e 8.4)	Dez. e Jan. de 2018	Replicata da extração 8.0 M utilizando o agitador a; dobro da quantidade de peles.	Formação de um gel e filme fino com parte da amostra vertida em uma superfície de polipropileno
Grupo B (8.5; 8.6; 8.7; 9.1; 9.2)	Ago. de 2018	Replicata da extração 8.0 M utilizando o agitador a; dobro da quantidade de peles.	Formação de um gel e filme de colágeno
Grupo D (8.7P e 8.8P)	Mar. de 2019	Extração com as patas da rã; metodologia - Replicata da extração 8.0 M utilizando o agitador a	Formação de um gel e filme de coloração amarelada
8.8 M	29/01/18	Replicata da extração 8M- Agitador a	Formação de um gel e filme
8.9P M	19/03/19	Patas - Replicata da extração 8M	Amostra líquida
9.0 P M	05/08/19	Patas - Replicata da extração 8M- Agitador a	Amostra líquida
Grupo C (9.31; 9.32; 9.41; 9.42 e 9.5)	Dez. 2019	Replicata da extração 8.0 M utilizando o agitador b; dobro da quantidade de peles.	Formação de um gel e filme de colágeno

TCC = Extrações realizadas no TCC; M = Extrações realizadas no mestrado; PM = Extração de colágeno das patas

Preparação das peles e das patas

O pré-tratamento do couro tem como foco a retirada de sujidades e a separação de moléculas colagênicas das não colagênicas.

Inicialmente, as peles foram introduzidas em um béquer de 2000 mL contendo solução de NaCl ($0,8 \text{ mol.L}^{-1}$) por 60 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente, a pele pré-tratada foi imersa em um béquer contendo solução de NaOH ($0,2 \text{ mol.L}^{-1}$) permanecendo, ainda, a temperatura ambiente por 90 minutos. Por fim, o material foi colocado na presença de solução de ácido acético ($0,5 \text{ mol.L}^{-1}$) por 180 minutos sob resfriamento até 10°C . O fluxograma representado na Figura 20 mostra as etapas do tratamento da pele e da pata.

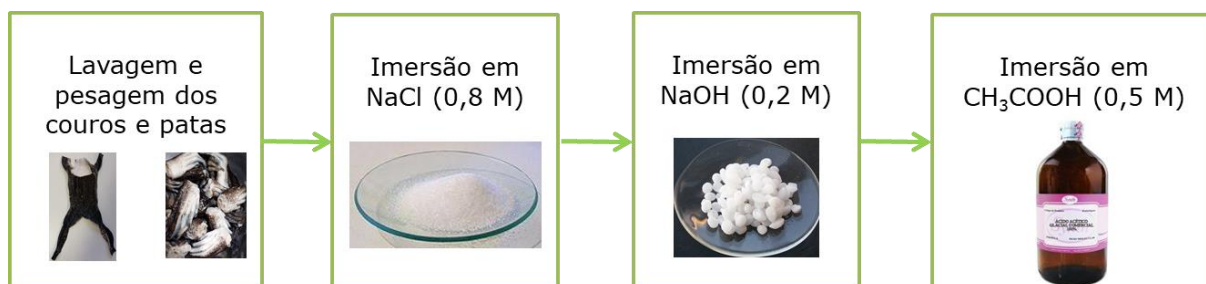


Figura 20: Fluxograma do processo pré-tratamento das pele e patas para o processo de extração de colágeno

Extração do colágeno

A metodologia de extração de colágeno a partir do couro de rã-touro empregada nesse trabalho baseou-se nos procedimentos descritos por Alfaro (2013), Souza (2015) e Karnjanapraturm (2017)

As peles das rãs previamente tratadas foram imersas em água deionizada a uma variação de temperatura de 35 a 45°C , sob agitação mecânica por 6 horas. A solução resultante foi filtrada usando um funil e filtro de pano comercial. Parte do filtrado obtido foi vertido em placa de polipropileno e o restante armazenado em frasco, também, de polipropileno. Ambos foram armazenados sob refrigeração. O couro

residual foi devolvido a empresa e destinado a compostagem de acordo com os procedimentos padrões utilizados pela mesma.

O processo de extração do colágeno tipo gel e filme está representado de acordo com o fluxograma da Figura 21.



Figura 21: Fluxograma do processo de extração de colágeno tipo filme e gel

Para o processo de extração foram utilizados dois diferentes agitadores mecânicos (a: Fisaton; b: IKA Ministar 20 – Figura 19). A troca foi realizada para que fosse possível determinar a rotação possibilitando obter resíduos triturados ao final do processo das amostras do grupo C.

Além disso, as patas da rã também foram usadas para extração do colágeno seguindo a mesma metodologia descrita anteriormente. Os materiais colagênicos obtidos a partir da pele e pata foram congeladas em nitrogênio líquido e liofilizados usando um equipamento da Marca: TERRONI EQUIPAMENTOS LTDA. Mod.: LT 600.

4.2.1 Caracterização

As caracterizações realizadas nos materiais colagênicos obtidos foram: (i) pH (ii) resíduo mineral fixo (cinzas), (iii) absorção de água e ângulo de contato, (iv) ensaio mecânico uniaxial de tração, (v) espectroscopia de absorção na região do infravermelho (Do inglês *Infrared spectroscopy with Fourier Transform*, FTIR), (vi) análise TermoGravimétrica (TG), (vii) calorimetria exploratória diferencial (Do inglês *Differential Scanning*

Calorimetry, DSC) e (viii) determinação de Nitrogênio Total (NT) pelo método de Kjeldahl. As caracterizações das amostras de colágeno obtidas estão representadas no fluxograma da Figura 22.

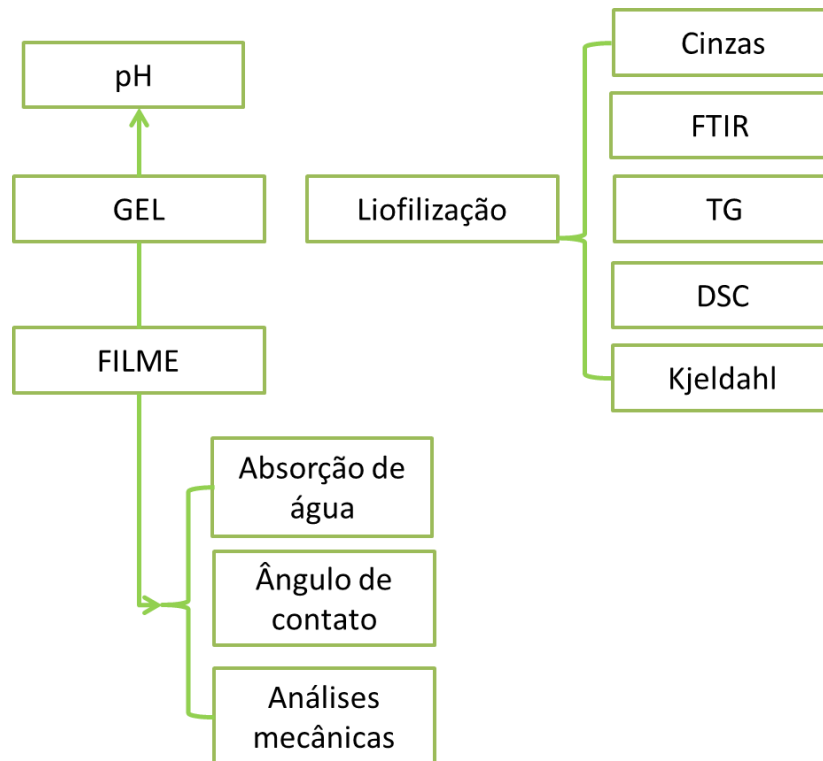


Figura 22: Fluxograma dos processos de caracterização das amostras de colágeno

4.2.1.1 Determinação do pH das amostras de gel de colágeno

Para a determinação de pH das amostras de gel de colágeno e das soluções das amostras dos grupos A (8.1, 8.2, 8.3, 8.4), B (8.5, 8.6, 8.7, 9.1, 9.2), C (9.31, 9.32, 9.41, 9.42 e 9.5), D (8.7P, 8.8P) e a amostra 8.0, preparadas utilizou-se pHmetro (DM 22 -Digitalmed) devidamente calibrado à uma temperatura de 25 °C. O pH das amostras foi medido na amostra de colágeno em gel.

4.2.1.2 Determinação do ângulo de contato e da capacidade de absorção de água em filmes de colágeno

A determinação da absorção de água no filme de colágeno e o ângulo de contato foi realizada para as amostras 8.4, 9.31 e 9.5, uma amostra representativa dos grupos A e C e em função das condições de tempo e armazenamento das amostras.

Em cada filme foi adicionada uma gota de água de volume 0,1 mL com auxílio da micropipeta de 10 μ L - 100 μ L. O ângulo de contato foi realizado utilizando o Microscópio U500X Digital (MARCA: Cooling Tech) e o valor foi obtido utilizando o software Image J. Para determinação do tempo de absorção da de água mediu-se o tempo a partir do instante em que a gota foi colocada sobre o filme até sua total absorção.

4.2.1.3 Determinação do comportamento mecânico utilizando o ensaio de tração do filme de colágeno

As amostras de filme de colágeno da extração 9.5 foram cortadas com um molde de formato "gravata", segundo a norma ASTM (*American Society for Testing and Materials*) D638 – 14 conforme mostrado a Figura 23.



Figura 23: Filmes de colágeno utilizados no ensaio de tração

O ensaio de tração uniaxial foi realizado utilizando a máquina de ensaios mecânicos Instron IMC 23 20, com uma célula de carga 0,5 KN, à temperatura ambiente e velocidade de 10 mm / min. Os dados gravados obtidos no ensaio foram usados para traçar a curva de a tensão de tração – deformação dos filmes 8.4, 9.31 e 9.5, amostras representativas dos grupos A e C.

4.2.1.4 Determinação do teor de resíduo mineral fixo (cinzas)

Para a determinação de cinzas seguiu-se o método descrito pelo INSTITUTO ADOLFO LUTZ para as amostras dos grupos A (8.1, 8.2, 8.3, 8.4), B (8.5, 8.6, 8.7, 9.1, 9.2), C (9.31, 9.32, 9.41, 9.42 e 9.5), D (8.7P, 8.8P) e a amostra 8.0. Em uma balança analítica da marca Shimadzu, modelo ATX 224, foi medida aproximadamente 100 mg de amostra de colágeno, em triplicata, e adicionou-a a uma cápsula de porcelana previamente aquecida em um forno de mufla Quimis, modelo Q318M a 550 °C.

As cápsulas contendo a amostra foram colocadas na mufla à 550 °C permanecendo por duas horas, até que todo o material contido fosse carbonizado. Posteriormente foram resfriadas em dessecador de vidro contendo sílica até a temperatura ambiente e pesadas.

O teor de cinzas foi determinado a partir da equação 5:

$$\% \text{ Cinzas} = \frac{M2-M1}{M} * 100 \quad (\text{Equação 5})$$

M – Massa da amostra inicial

M2 – Massa do cadinho com amostra à temperatura ambiente

M1 – Massa do cadinho com amostra carbonizada (cinzas)

4.2.1.5 Espectroscopia de absorção na região do infravermelho (Do inglês *Infrared spectroscopy with Fourier Transform, FTIR*)

As análises de FTIR das amostras de colágeno dos grupos A (8.1, 8.2, 8.3, 8.4), B (8.5, 8.6, 8.7, 9.1, 9.2), C (9.31, 9.32, 9.41, 9.42 e 9.5) e D (8.7P, 8.8P) e a amostra 8.0 foram realizadas utilizando um espectrofotômetro da marca Shimadzu modelo IRPrestige – 21. O equipamento é acoplado com acessórios ATR, as amostras foram

colocadas diretamente sobre o cristal de KrS_5 . O intervalo de número de onda de 4000 a 400 cm^{-1} e 64 *scans*.

4.2.1.6 Análise termogravimétrica (TG)

Para a determinação da estabilidade térmica do colágeno, foram obtidas curvas termogravimétricas utilizando 10 mg das amostras dos grupos A (8.1, 8.2, 8.3, 8.4), B (8.5, 8.6, 8.7, 9.1, 9.2), C (9.31, 9.32, 9.41, 9.42 e 9.5), D (8.7P, 8.8P) e a amostra 8.0, em atmosfera de gás N_2 .

A razão de aquecimento foi variável, de acordo com o seguinte protocolo: 5 $^{\circ}\text{C}/\text{min}$, temperatura variando de ambiente até 100 $^{\circ}\text{C}$; 10 $^{\circ}\text{C}/\text{min}$ até 200 $^{\circ}\text{C}$ e 20 $^{\circ}\text{C}/\text{min}$ até 600 $^{\circ}\text{C}$. O equipamento utilizado foi uma balança termogravimétrica da marca Shimadzu, modelo DTG-60H.

4.2.1.7 Calorimetria exploratória diferencial (Do inglês *Differential Scanning Calorimetry*, DSC)

A calorimetria exploratória diferencial foi utilizada para determinação da Temperatura de desnaturação (T_d) do colágeno. As curvas de DSC foram obtidas por um equipamento da marca Shimadzu, modelo DSC 6000 em atmosfera de N_2 , previamente calibrado com Índio de alto grau de pureza. Para obtenção das curvas de DSC, as amostras de colágeno, aproximadamente 3 mg, foram aquecidas a uma taxa de 25 $^{\circ}\text{C}/\text{min}$, na faixa de 0 a 150 $^{\circ}\text{C}$ e resfriadas até 0 $^{\circ}\text{C}$.

4.2.1.8 Determinação de proteínas totais por método de Kjeldahl

DÚVIDA: SE EU JA CITEI O NOME DO COMPOSTO E A SIGLA ANTERIORMENTE, PRECISO ESCREVER O NOME DE NOVO? OU S'A SIGLA?

Para a digestão da amostra, aproximadamente 0,20 g de colágeno liofilizado foram pesadas em balança analítica sobre papel vegetal. Posteriormente adicionada a um tubo digestor de micro Kjeldahl. Ao tubo

contendo a amostra foram adicionados 2,00 g de mistura catalítica de sulfato de cobre e sódio e 3,00 mL de H₂SO₄ PA. A solução foi agitada e digerida em um bloco digestor.

Ao tubo digestor de micro Kjeldahl foram adicionados 15 mL de água destilada até total dissolução da amostra. O tubo foi resfriado em água corrente e colocada no destilador. Ao destilado (marca: Marconi modelo: MA036) foram adicionados aproximadamente 10,00 mL de solução de NaOH 40 % (m/v). O aquecimento foi acionado e ao fio do condensador foi colocado um Erlenmeyer contendo 10,00 mL de H₃BO₃ 3% (m/v) e três gotas de indicador misto. A torneira foi aberta e iniciou-se a destilação, até o término da evaporação e condensação de toda a amônia presente na amostra. O aquecimento foi desligado e a amostra resfriada.

O Erlenmeyer contendo a solução de borato de amônio foi titulado com uma solução de HCl 0,10 M. O volume titulado foi anotado e os cálculos para determinação da quantidade de amônia realizados.

A partir de uma correlação matemática, equação 6, determinou-se o teor de Nitrogênio Total (NT) e posteriormente a concentração de proteínas do produto.

$$NT = \frac{V \times fc \times C \times 0,014 \times 100}{m} \quad (\text{Equação 6})$$

Onde V corresponde ao volume gasto da solução de HCl no processo de titulação, C é a concentração da solução e fc, seu respectivo fator de correção. A quantidade de nitrogênio medida em miliequivalente grama é 0,014 (MM Nitrogênio = 14 g mol⁻¹/1000) e m é a massa em gramas de amostra utilizado. Os volumes da solução de HCl, a massa das amostras, o fc e o teor de Nitrogênio total foram determinados e descritos no item 5.3.9.

A determinação da proteína bruta na amostra, em porcentagem, foi calculada pelo produto do teor de NT da amostra com um fator de conversão do Nitrogênio total em proteína. Para uma amostra de colágeno, o fator de correção (Fn), segundo a *Association of Analytical*

Chemists (AOAC) de 2006, é igual a 5,7. O teor da proteína bruta (PB) nas amostras de colágeno foi calculado a partir da equação 7:

$$PB = NT \times Fn \quad (\text{Equação 7})$$

4.2.1.9 Determinação do teor de colágeno por grama de gel

O teor de colágeno (quantidade de colágeno seco por quantidade de gel) das amostras dos grupos A, B, C e D foi determinado a partir da diferença de massa úmida e seca, conforme a equação 8.

O béquer foi seco em estufa (marca: SPLabor modelo: SP100) a 120 °C por 3h e a ele foram adicionados aproximadamente 1 g de amostra em gel. Posteriormente o béquer contendo a amostra foi submetido à secagem à 60 °C em estufa por 24h. Quando atingida a temperatura ambiente, aferiu-se a massa do béquer com a amostra seca em uma balança analítica da marca Shimadzu, modelo ATX 224.

$$\% \text{ Colágeno (t)} = \frac{M2 - M1}{M} * 100 \quad (\text{Equação 8})$$

M – Massa da amostra em gel

M2 – Massa do béquer com amostra seca

M1 – Massa do béquer

4.2.1.10 Determinação do rendimento da extração

A determinação do rendimento das amostras 8.4, 8.7, 9.1, 9.2, 9.32, 9.41 e 9.42 foi determinado a partir de uma equação 9. A equação relaciona o teor de colágeno no gel (t), densidade do gel (d) e massa de pele inicial (M), permitindo determinar a quantidade em gramas de colágeno por grama de pele. A densidade do gel foi calculada pela razão entre a massa de gel pelo seu volume.

$$\text{Rendimento (g/g)} = \frac{d * 1000 * t}{M} \quad (\text{Equação 9})$$

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

As peles e patas foram fornecidas pela empresa Frigorã. Elas apresentavam uma coloração verde escuro com manchas marrons na parte superior do corpo da rã e branca com manchas marrom nas extremidades na parte inferior, como mostrado na Figura 24. As peles possuíam um tamanho aproximado de 25 cm de comprimento e 15 cm de largura (Figura 24 a) e b)), com uma massa média, por pele, de 25 a 33 g. O lote de patas, em função da massa, foi de aproximadamente 260 g e nelas notou-se a presença de resíduos minerais da matriz óssea - Figura 24 c).

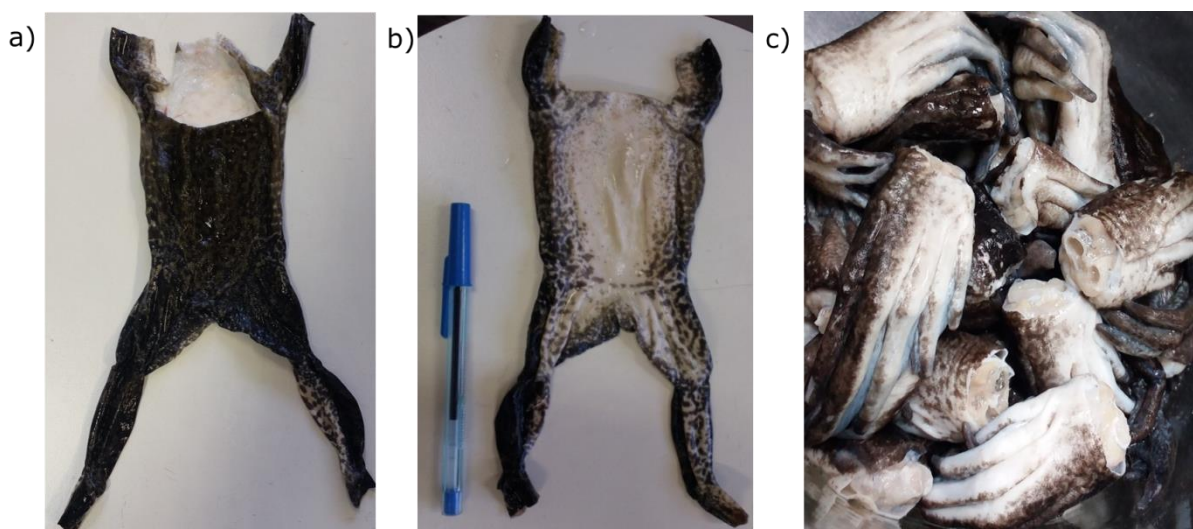


Figura 24: Fotografia do couro de rã superior (a) inferior (b) e patas de rã (c) fornecido pela empresa Frigorã

A matéria prima foi submetida a um pré tratamento para a eliminação de resíduos e obtenção de um colágeno mais puro. Vale ressaltar que os processos de pré-tratamento e extração foi o mesmo para peles e patas, mas ocorreram separadamente.

5.1 Pré – tratamento

O processo de pré tratamento com a solução de Cloreto de Sódio (NaCl) objetivava promover a remoção de compostos solúveis (Li, 2003). Neste processo observou-se o desprendimento da camada superficial da

pele (epiderme), conforme a Figura 25 a) mostra. O mesmo ocorreu com a pele das patas.

Para remoção de proteínas não colagênicas (NAGAI, 2000; Karnjanapratum 2017), iniciou o tratamento com a solução de Hidróxido de sódio (NaOH). Neste processo notou-se que as peles e a superfície das patas apresentaram-se inchadas e gelatinosas Figura 25 b), de difícil aderência. E a solução esverdeada. Ao final, a solução apresentou-se límpida, o que nos permite inferir que o processo de limpeza foi eficiente.

O inchaço das peles e patas era esperado levando em consideração que as interações de hidrogênio da cadeia peptídica hidrolizariam-se de modo a desorganizar a estrutura da proteína produzindo um inchaço.

O processo inicial da extração e final do pré tratamento (tratamento químico para remoção de compostos insolúveis (ZHANG, 2014) foi realizado utilizando-se uma solução de Ácido Acético (CH_3COOH). O processo ocorreu sob refrigeração levando em conta os estudos de Pati, Adhikari e Dhara (2010). Segundo os autores, o controle da temperatura na primeira etapa da extração é fundamental para que a estrutura do colágeno permaneça íntegra.

Ao final desse processo de tratamento em solução ácida, as peles apresentaram-se desinchadas e frágeis. Facilmente danificadas e trituráveis – Figura 25 c).



Figura 25: Fotografia Couro da rã durante o processo de limpeza com solução de a) Cloreto de Sódio (NaCl) e b) Hidróxido de Sódio (NaOH) c) Ácido Acético (CH_3COOH)

Depois de tratados em soluções alcalinas e ácidas, os couros foram lavados e submetidos ao processo de extração sob agitação mecânica.

5.2 Extração do colágeno da rã touro

No final do processo de extração do colágeno com o agitador mecânico a) a maioria das peles apresentaram-se intactas. Enquanto as patas, em sua totalidade apresentaram-se inteiras. Optou-se por trocar o agitador para que as peles fossem trituradas em sua totalidade. Desta forma, haveria uma maior superfície de contato entre a pele e a solução, possibilitando obter uma maior quantidade de colágeno, consequentemente, maior rendimento.

Com o uso do agitador mecânico digital b), observou-se que a uma rotação acima de 900 rpm as peles de rã trituravam-se - Figura 26. O agitador b) não foi utilizado para a extração com patas. O colágeno obtido a partir da pele triurada apresentou-se de difícil filtração, uma vez que, à temperatura ambiente o produto tornava-se gel de forma rápida, levando ao entupimento dos poros do filtro.



Figura 26: Registro fotográfico da pele de rã triturada

Segundo a literatura, na presença de ácidos, o colágeno tende a absorver quantidades consideráveis de água.

A reação de hidrólise ácida do colágeno sob aquecimento possibilitou a quebra das ligações covalentes cruzadas das estruturas de colágeno. Quando retomada a temperatura ambiente, devido a presença de água no meio, novas interações de hidrogênio foram formadas entre o colágeno e as moléculas de água. O colágeno apresentou um volume de gel total igual ao de água adicionada durante o processo de extração.

As novas interações formadas são fundamentais para a estabilidade da estrutura colagênica, segundo os estudos de Brandts (1969). Esse tipo de interação faz com que as moléculas se agrupem em micelas formando um produto semi-sólido que se liga às moléculas de água (PARK, 2003).

Essas interações só foram possíveis devido a presença do ácido, levando ao colágeno a um inchaço (NEKLYUDOV, 2003) e maior fixação com a água. Segundo Melo Filho (2011) essa fixação, ocorre devido ao aumento da carga líquida e das forças repulsivas. E tende a diminuir com o aumento da temperatura devido a ruptura das ligações de hidrogênio formadas.

O processo de extração proposto possibilitou a obtenção de dois produtos. Não se tem relatos na literatura de um processo parecido que leve a obtenção de dois produtos diferentes a partir de um mesmo processo. O produto obtido, denominado "gel", apresentou coloração acinzentada com consistência gelatinosa, Figura 27 a). Enquanto o filme apresentou-se translúcido e maleável e com o formato do molde usado para secagem, Figura 27 b).

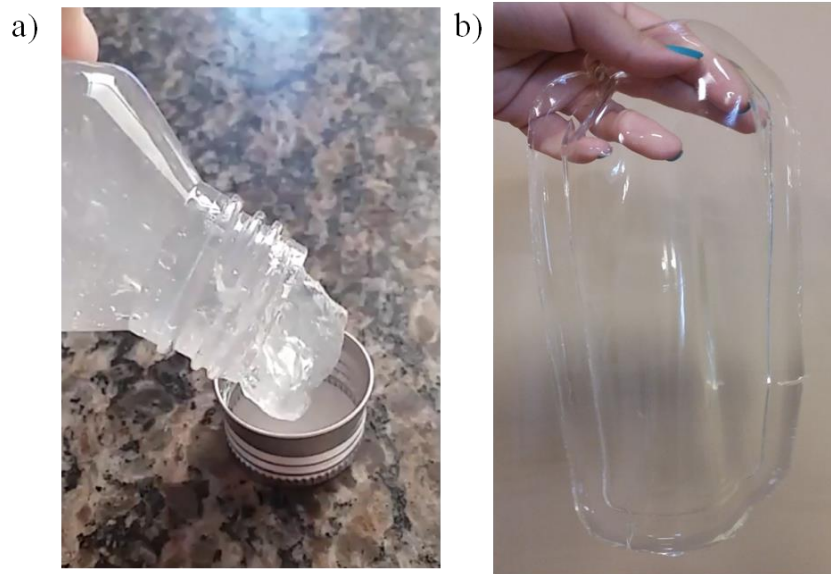


Figura 27: Fotografia do colágeno: a) em gel e b) filme

O gel foi armazenado em frasco de polipropileno, sob refrigeração. O filme também foi armazenado sob refrigeração, mas para avaliação do efeito da água sobre o mesmo, de duas formas diferentes: tampado e destampado. Notou-se que quando destampado o colágeno apresentou-se enrugado, rígido, mas ainda maleável – Figura 28.



Figura 28: Fotografia do filme de colágeno 9.5 armazenado destampado

Notou-se uma diferença entre os filmes que foram armazenados de formas diferentes. O filme destampado apresentou características de um filme “seco”, ideal preparação de corpos de prova para posterior realização do teste de tração, ângulo de contato e absorção de água. As características dos filmes submetidos a diferentes formas de armazenamento nos permite inferir que a presença da tampa proporcionou a conservação da umidade do filme.

5.3 Caracterizações

5.3.1 Medidas do pH

O pH das amostras foi medido utilizando um pHmetro (DM 22 - Digitalmed) devidamente calibrado. As amostras em gel foram retiradas do resfriamento e quando atingida a temperatura de 25 °C, o pH foi medido. Os valores médios encontrados para cada grupo de amostras estão expressos na Tabela 5.

Tabela 5: pH das amostras de colágeno em gel

Amostras/ grupos	pH
8.0	4,25
A	4,36
B	5,20
C	4,79
D	6,45

O pH das amostras do gel de colágeno das peles analisadas variou de 4,25 a 5,20, enquanto para o gel de colágeno das patas o pH médio foi de 6,45. A variação do pH das amostra de colágeno da pele é um indício de que na amostra de colágeno há presença de resíduo de solução ácida, não removido em sua totalidade, uma vez que o processo de extração pode ter grande influência no valor do pH final do colágeno (MUYONGA, 2004).

O pH médio encontrado para o gel de colágeno das patas apresentou-se superior ao das peles. Uma hipótese para a diferença no valor do pH médio é a presença da matriz residual óssea na matéria prima das patas. A presença desse tecido provavelmente impossibilitou o contato total da matéria prima com as soluções de pré-tratamento e com a solução de extração, levando a uma extração de colágeno incompleta.

Uma extração incompleta levaria a amostra de gel conter uma quantidade de água livre suficiente para que o pH da amostra seja o da água e não o de colágeno. Segundo Neklyudov (2003) e Li (2020), o ponto isoelétrico do colágeno nativo encontra-se na faixa de 6,5 e 8,5. Em pH distinto do ponto isoelétrico, as moléculas de colágeno tendem a fixar-se às moléculas de água devido ao aumento da carga líquida (MELO FILHO, 2011; LI, 2020).

A carga líquida das moléculas de proteína sendo maior que zero, a solubilidade da proteína será aumentada pelas forças de repulsão entre as cadeias (TAN, 2018), portanto, pode-se dizer que a solubilidade do colágeno é aumentada em pH inferior a 6,5 e superior a 8,5.

Segundo estudos realizados por Tonhi e Plepis (2002) e Tan (2018) a solubilidade do colágeno diminui a pH superior a 5, um valor inferior ao mínimo da faixa do ponto isoelétrico do colágeno. Sendo assim, segundo os resultados obtidos, a amostra de gel de colágeno das patas apresenta uma solubilidade inferior que as amostras de gel de colágeno das peles 8.0 e dos grupos A e C.

Quando comparado ao colágeno nativo e ao encontrado por Tumerkan (2019) para gelatina de colágeno (pH 7,12), os pH's encontrados para as amostras de gel de colágeno de rã apresentam valor inferior. Mas apresentam-se próximo ao encontrado por Prestes (2013) para colágeno hidrolisado (5,98). Logo, infere-se que o colágeno em questão, em função do seu pH, é do tipo hidrolisado.

O valor do pH é um importante parâmetro a ser analisado levando-se em consideração que este pode restringir seu uso em alguns produtos. O pH ideal para o crescimento de microorganismos varia de 5 a 8 (HALLA, 2018). Qualquer pH fora dessa faixa induz condições desfavoráveis ao crescimento microbiano.

Os pH's encontrados para as amostras de gel 8.0 e dos grupos A, B, C e D apresentaram-se desfavoráveis ao crescimento de microorganismos, permitindo que o mesmo seja utilizado na produção de produtos cosméticos. Uma vez que, os microorganismos não podem

proliferar ou sobreviver em uma formulação cosmética com um pH menor que 4 ou maior que 10 (HALLA, 2018).

Segundo o Ministério da Agricultura (2018) o colágeno comestível deve apresentar pH entre 4,5 e 6,5. Desta forma, para fins alimentícios todos as amostras de colágeno poderiam ser utilizadas no que diz respeito a esse critério específico.

5.3.2 Determinação da absorção de água em filmes de colágeno e ângulo de contato

Para fins de aplicação na área, avaliou-se o tempo em que os filmes 8.4 (grupo A) (Figura 29), 9.2 (grupo B) (Figura 30), 9.5 (Figura 31) (grupo C) e 9.31 (Figura 32) (grupo C) absorveriam água. As amostras do grupo D não formaram filme de espessura suficiente para realização da análise, por isso não foram avaliadas.

Ambos os filmes foram armazenados sob refrigeração. Os filmes (8.4, 9.2 e 9.5) foram armazenados em recipiente aberto e o filme 9.31, em um recipiente fechado. A escolha dos filmes para comparação quanto a influência das condições de armazenamento foi feita com base no tempo de realização da extração. Escolheu-se os filmes 9.31 e 9.5 do grupo C visto que foram os filmes mais recente preparados.

A absorção da água foi determinada a partir do tempo que uma gota de água demorou para ser absorvida pelo filme de colágeno. Para isso foi realizada uma filmagem do processo e o tempo de absorção foi então determinado com base tempo do filme, do instante que a gota foi adicionada, até sua total absorção.

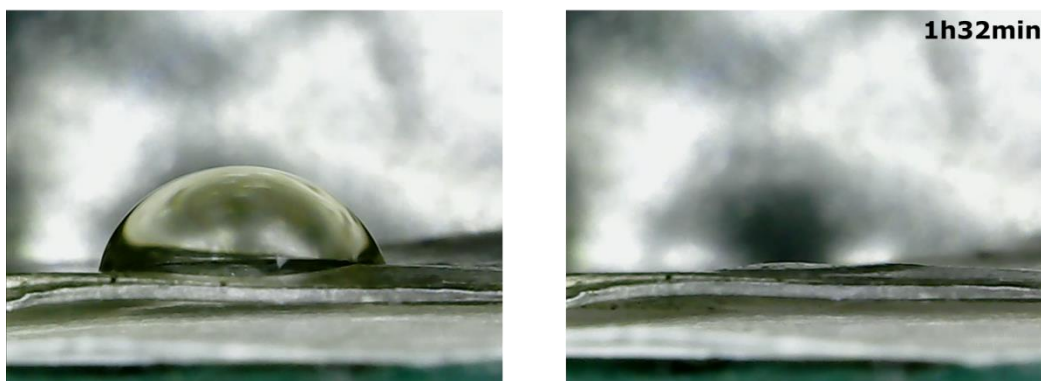


Figura 29: Imagens do teste de ângulo de contato e absorção de água do filme da reação 8.4 (grupo A) armazenada sob refrigeração sem tampa

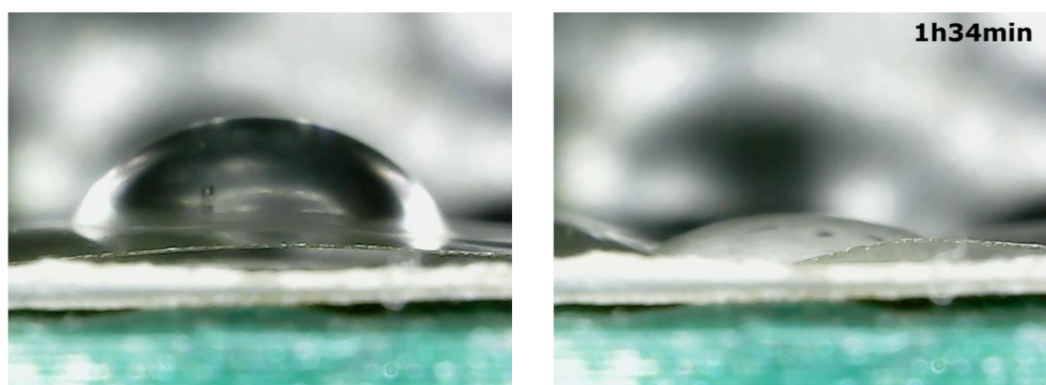


Figura 30: Imagens do teste de ângulo de contato e absorção de água do filme da reação 9.2 (grupo B) armazenada sob refrigeração sem tampa

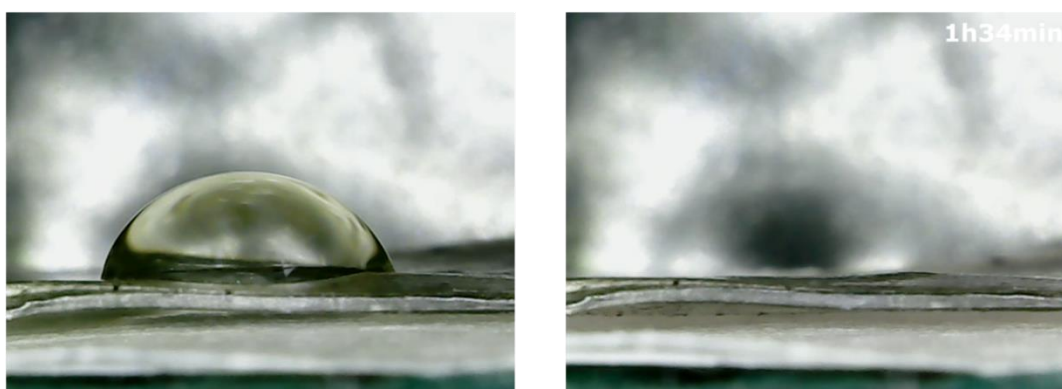


Figura 31: Imagens do teste de ângulo de contato e absorção de água do filme da reação 9.5 (grupo C) armazenada sob refrigeração sem tampa

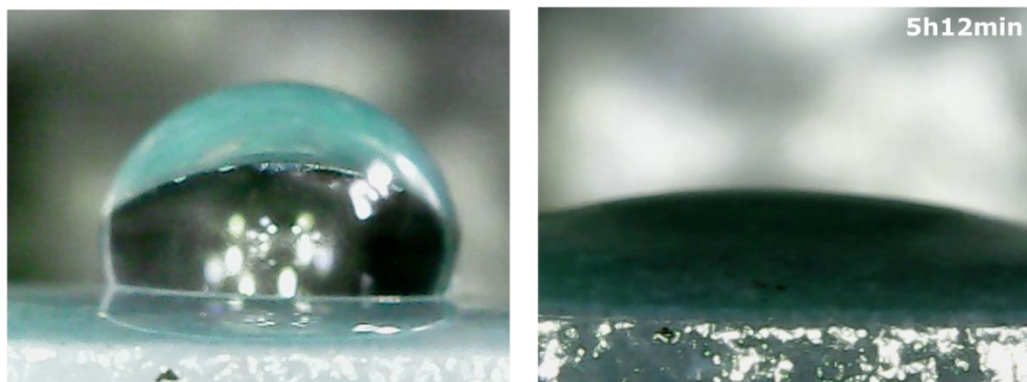


Figura 32: Imagens do teste de ângulo de contato e absorção de água do filme da reação 9.31 (grupo C) armazenado sob refrigeração com tampa

Pelo tempo de absorção da gota de água notou-se que quando o recipiente permaneceu fechado, seu aspecto se conservou e o filme continuava maleável com aparência de “gel” (Figura 27 b). Entretanto, quando o recipiente permaneceu aberto o filme apresentou-se parcialmente seco e rígido (Figura 28).

Como mostram as Figuras 29 a 31, o tempo médio de absorção de água para um filme de colágeno seco armazenado sob refrigeração é de 1 hora e 30 minutos. Para o filme armazenado em recipiente fechado (para preservação da umidade) – Figura 32, o tempo foi de 5h:30min.

O tempo de absorção da gota de água do filme úmido foi superior ao tempo do filme seco. O tempo de absorção da gota de água está relacionado com a força da interação da água na superfície do filme (CRICK e PARKIN, 2010) e com as interações de hidrogênio que a água absorvida faz com os grupos hidrofílicos internos da cadeia do filme de colágeno (LIU et al., 2017).

Quando o filme está úmido, a água tende a se ligar aos a.a. da estrutura do colágeno, tendendo a não interagir facilmente com a água adicionada à superfície. Os grupos O-H ficam menos disponíveis para realizar interações com a água de umidade. Quando o filme está “seco”, há uma tendência maior de interação entre a água e a superfície, promovendo sua molhagem.

A diferença no tempo de absorção da água por filmes úmidos e secos pode ser confirmada pela determinação do ângulo de contato formado entre superfície do filme e a gota de água. O ângulo de contato é uma caracterização utilizada, principalmente, na determinação da sua molhabilidade (RATNER, 1990). Segundo Ratner (1990) a molhabilidade do material pode ser determinada a partir do seu ângulo de contato entre a superfície e o solvente utilizado, normalmente, água, medido imediatamente depois de adicionar a gota (Figura 33).

> 90° Não-molhabilidade / Hidrofóbico

< 90° Molhabilidade / Hidrofílico

= 90 ° Limite entre não-molhabilidade e molhabilidade.

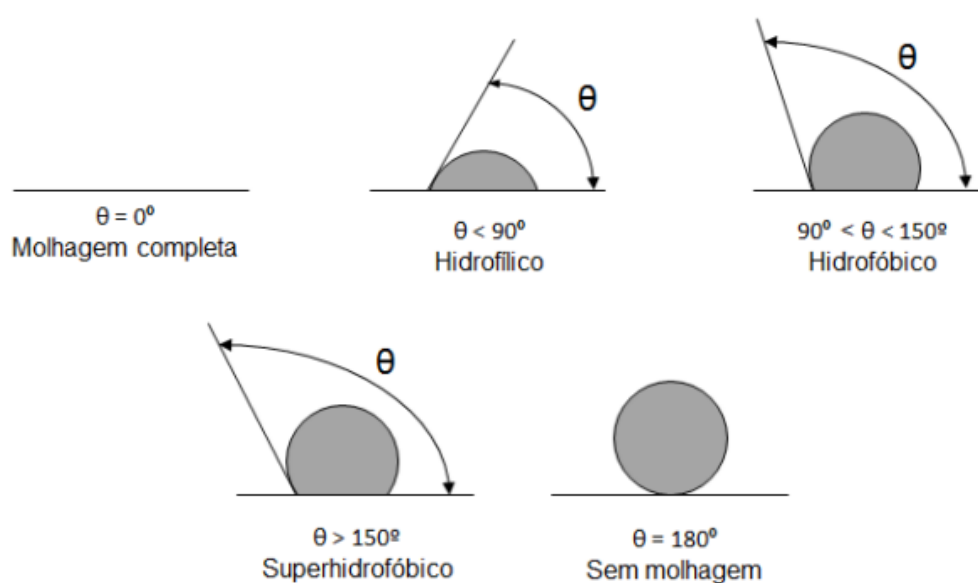


Figura 33: Esquema da determinação da molhabilidade de uma superfície de acordo com seu ângulo de contato

O ângulo de contato das amostras de filme 8.4 (grupo A) (Figura 29), 9.2 (grupo B) (Figura 30), 9.5 (Figura 31) (grupo C) e 9.31 (Figura 32) (grupo C) foram determinados utilizando água, visto que é um solvente comumente utilizado para biomateriais (RATNER, 1990) e estão representados na Tabela 7.

Tabela 6: Ângulo de contato das amostras de filme de colágeno 8.4 (grupo A), 9.2 (grupo B), 9.5 (grupo C) e 9.31 (grupo C)

Filme	Ângulo (°)	Média (°)	D.P.
8.4 (grupo A)	74,41	74,410	3,706
	80,98		
	72,27		
9.2 (grupo B)	62,1	61,540	1,274
	59,16		
	61,54		
9.31 (grupo C - úmido)	102,381	93,120	6,5059
	93,12		
	86,519		
9.5 (grupo C - seco)	74,168	74,170	2,063
	74,528		
	69,982		

A partir do conceito de Ratner (1990) quanto a molhabilidade das amostras com base no ângulo de contato, conclui-se que o filme 9.31 (grupo C - úmido) é hidrofóbico (pouca molhabilidade) e os filmes 8.4 (grupo A), 9.2 (grupo B) e 9.5 (grupo C - seco), são hidrofílicos (molhabilidade mais intensa). A partir dos resultados encontrados a respeito do ângulo de contato, nota-se que a quantidade de água ligada às moléculas de colágeno influencia significativamente na hidrofobicidade do filme (CRICK e PARKIN, 2010).

Em um estudo realizado por Ding, Zhang e Li (2015) a respeito da hidrofobicidade do colágeno de boi os autores encontram um valor próximo de 88°. Este valor também é encontrado por Liu *et al.* (2017) para uma amostra de filme de colágeno de porco.

Os ângulos de contato obtidos para o colágeno de rã presentes no trabalho foram inferiores aos encontrados pelos autores. Levando em consideração que a quantidade de água presente no filme de colágeno influencia na hidrofobicidade do gel, infere-se que a quantidade o filme de colágeno de rã analisado encontra-se mais seco do que os filmes de colágeno de boi e porco analisados pelos autores.

5.3.3 Determinação das propriedades mecânicas do filme de colágeno

O ensaio de tração uniaxial foi realizado com cinco corpos de prova preparados segundo a norma ASTM D638 do filme de colágeno de pele de rã da extração 9.5. A escolha do filme foi realizada com base no tempo e condições de armazenamento.

Os filmes de colágeno dos grupos A e B foram armazenados úmidos e por um longo período de tempo. As condições de armazenamento e características do filme promoveu o crescimento microbiano no mesmo, não apresentando assim, condições para análise. Os filmes do grupo C, apesar de recentemente preparados, foram armazenados úmidos. Não sendo ideais para a análise. Apenas o filme 9.5, do grupo C, armazenado seco, apresentou idealidade para o ensaio de tração.

Os filmes de colágeno de patas de rã (grupo D) não foram utilizados para a análise uma vez que apresentaram-se imperfeitos e quebradiços em função da presença da matriz residual óssea presente nas amostras de patas. A presença desse tecido provocou uma formação de um filme corruptível pela presença de compostos inorgânicos na amostra de colágeno.

A Tabela 7 mostra os resultados do ensaio de tração uniaxial dos filmes de colágeno da amostra 9.5.

Tabela 7: Resultados do teste de tração com cinco filmes de colágeno de rã da amostra 9.5

	Máximo Tensão à tração (MPa)	Módulo de elasticidade (Young automático) (MPa)
1	38,13	665,94
2	34,72	627,3
3	27,21	683,45
4	26,79	531,4
5	33,86	407,02
Média	33,86	627,3
D.P.	4,43	102,53

O máximo de tensão à tração refere-se ao máximo de tensão que o filme suporta até sua ruptura. O valor médio encontrado para o filme de colágeno de rã foi de 33,86 Mpa, superior aos valores encontrados por Rodrigues e colaboradores (2017) (aproximadamente 12 Mpa, segundo a curva tensão x deformação) e Chen *et al.* (2009) (23Mpa) para filme de colágenode boi e o encontrado por Tonhi (2002)(22Mpa) para filme de colágeno de porco.

Segundo Rodrigues (2017) o colágeno de boi analisado apresentou características de um filme quebradiço. Esta observação também foi retratada nos trabalhos realizados pelos autores Chen *et al.* (2009) e Tonhi (2002). O colágeno de rã por sua vez não apresentou-se quebradiço, o que corrobora com os valores encontrados para o máximo de tensão à tração e módulo de elasticidade.

O módulo de elasticidade refere-se a resistência de um material à deformação elástica. Quanto maior o módulo de elasticidade, mais resistente e rígido o material à uma deformação elástica (CALLISTER, 2002). O valor médio do módulo de elasticidade nos permite inferir que o filme de colágeno de rã apresenta uma maior resistência quando comparado aos filmes de colágeno de boi e porco.

Esta característica está atribuída à estabilidade da fibra de colágeno em função das forças das ligações interatômicas entre as moléculas de colágeno e as de água, um plastificante natural. (CALLISTER, 2002).

A Figura 34 mostra as curvas tensão-deformação do filme de colágeno de pele de rã da amostra 9.5.

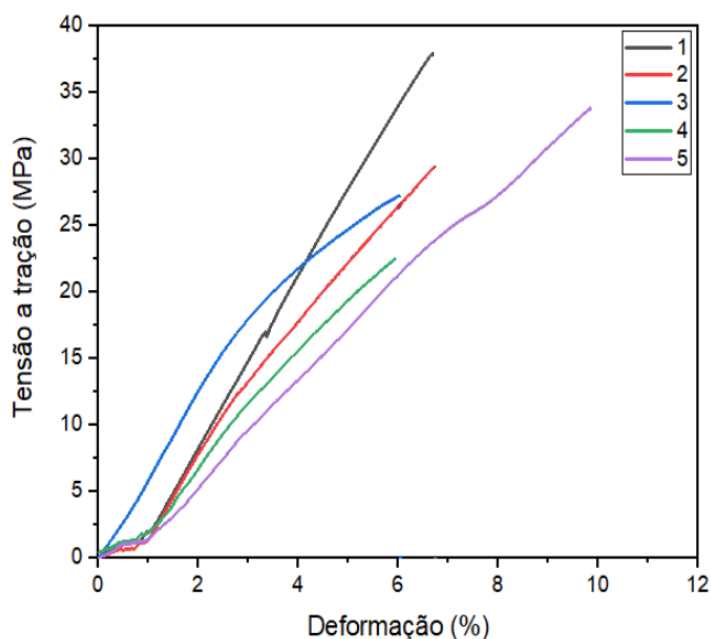


Figura 34: Curva de tensão à tração por deformação do filme de colágeno 9.5

O perfil da curva tensão-deformação é característico de um material polimérico de deformação elástica (CALLISTER, 2002). O filme analisado foi armazenado destampado e sob refrigeração. As condições de armazenamento levaram a perda, em parte, da sua umidade. Segundo Neklyudov (2003), sob condições normais, as fibrilas de colágeno são apenas ligeiramente extensíveis e quando umidecido, adquire elasticidade. Desta forma, é possível inferir que a presença de água no filme, sendo este composto um plastificante natural, levou ao filme ser mais resistente e menos plástico.

Apesar da sua versatilidade, a baixa resistência mecânica do colágeno limita o uso do seu filme. Assim, para aumentar a propriedade mecânica do biopolímero pode-se acrescentar ao filme um plastificante, como água e quitosana, capazes de estabelecer interações com a cadeia da proteína e aumentar melhor sua propriedade mecânica (MOREIRA, 2014).

5.3.4 Liofilização dos geis de colágeno

As amostras de colágeno em gel da pele e da pata obtidas foram submetidas à liofilização, para retirada da água e posterior caracterização. Com o processo de liofilização, a massa do gel úmido reduziu-se em 95%.

As amostras liofilizadas apresentaram um formato de acordo com frasco em que foram armazenadas e aspecto semelhante a uma espuma, – Figura 29 a). Nota-se pela Figura 29 b) que o colágeno obtido é formado de fibras organizadas de forma paralela. Segundo Kwansa (2013) essa organização das fibras proporciona elasticidade e resistência à estrutura (CHANDRY, 1997). Sendo sua capacidade de formar fibras estáveis através da reticulação a principal razão da sua elevada aplicabilidade na área biomédica e cosmética (LEE, 2001). Desta forma, infere-se que o colágeno obtido apresenta uma estrutura estável, resistente e elástica.

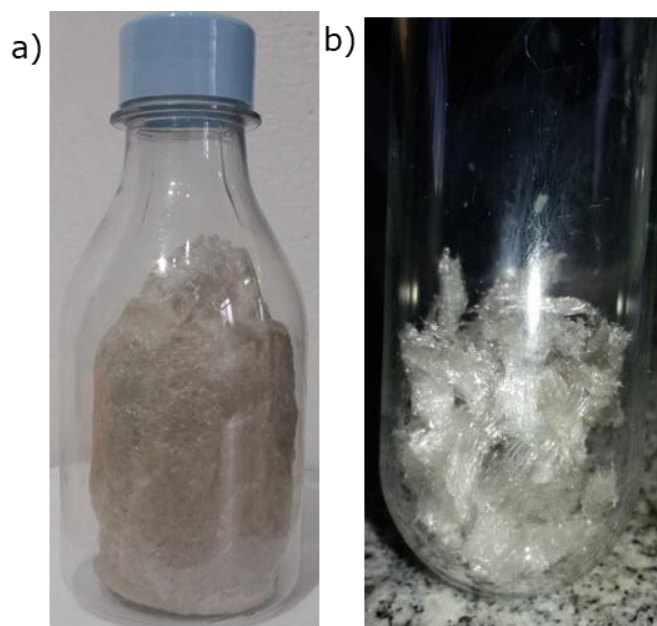


Figura 35: Amostras de gel após processo de liofilização a) no frasco armazenado; b) fragmentos do colágeno liofilizado

Notou-se que amostra de colágeno da pele era de cor branca, enquanto da pata, amarela – Figura 30. Segundo Della Torre (2005) a cor amarelada é característica de uma fibra de proteína elástica, ou seja, uma proteína rica em elastina e as fibras de proteína colágenas, são brancas. Acredita-se que a presença de matriz residual óssea na amostra da pata,

não removida no processo de extração, pode ter influenciado na coloração do colágeno. Uma vez que esse tecido é rico em compostos inorgânicos.

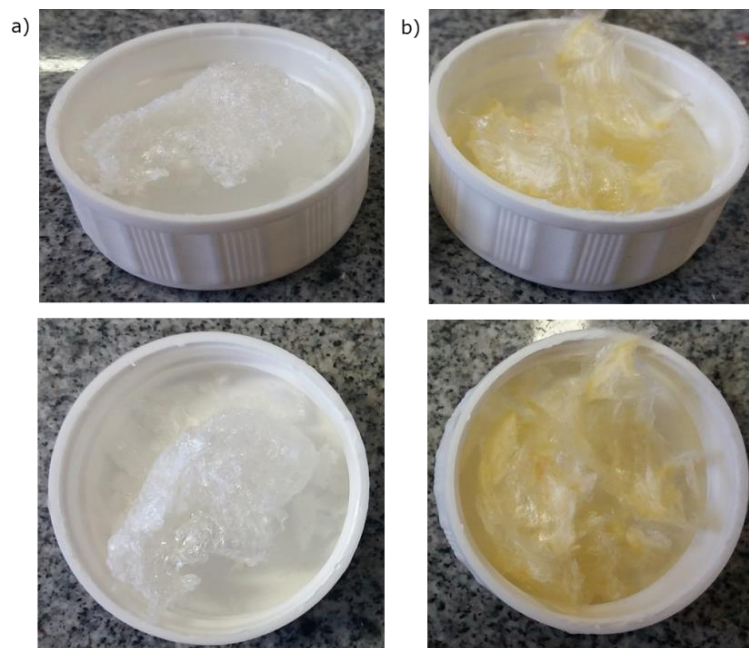


Figura 36: Amostras de colágeno liofilizadas: a) pele b) pata

A cor clara e transparência apresenta-se como uma propriedade importante para aplicação na indústria de cosméticos e farmacêutica. Embora, Schmitz et al. (2013) afirmam que a coloração não influencia nas propriedades funcionais.

5.3.5 Determinação do teor de resíduo mineral fixo (cinzas)

Para avaliar o grau de pureza das amostras de colágeno liofilizadas, determinou-se o teor de resíduo mineral fixo das amostras referente as extrações das amostras dos grupos A (8.1, 8.4), B (8.5, 8.6, 8.7, 9.1, 9.2), C (9.31, 9.32, 9.41, 9.42 e 9.5), D (8.7P, 8.8P) e a amostra base 8.0. Os valores encontrados estão presentes na Tabela 8.

As amostras 8.2 e 8.3 do grupo A não foram analisadas. Elas apresentaram uma contaminação com fungíca em função do armazenamento incorreto e excesso de água.

Tabela 8: Parâmetros obtidos na determinação do teor de minerais fixos (cinzas)

Amostra	Amostra Seca	Cinzas	%	Média	Desvio Padrão
80	0,1054	0,0019	1,8027	1,8027	0,00050
	0,1052	0,0008	0,7605		
	0,1011	0,0019	1,8793		
81	0,108	0,0013	1,2037	1,2037	0,00020
	0,1138	0,0008	0,703		
	0,1042	0,0013	1,2476		
84	0,1014	0,0041	4,0434	4,116	0,00030
	0,1069	0,0044	4,116		
	0,1053	0,0048	4,5584		
85	0,1027	0,0012	1,1685	1,5282	0,00020
	0,1047	0,0016	1,5282		
	0,1079	0,0018	1,6682		
86	0,0239	0,0003	1,2552	1,3953	0,00010
	0,0215	0,0003	1,3953		
	0,0234	0,0006	2,5641		
87	0,1012	0,0027	2,668	2,9825	0,00030
	0,1032	0,0031	3,0039		
	0,114	0,0034	2,9825		
91	0,103	0,0005	0,4854	0,6699	0,00020
	0,1031	0,001	0,9699		
	0,1045	0,0007	0,6699		
92	0,1011	0,0012	1,1869	1,1869	0,00010
	0,1056	0,0012	1,1364		
	0,1054	0,0015	1,4231		
931	0,0259	0,0003	1,1583	1,1673	0,00000
	0,0257	0,0003	1,1673		
	0,0257	0,0003	1,1673		
932	0,0229	0,0004	1,7467	2,008	0,00005
	0,0229	0,0005	2,1834		
	0,0249	0,0005	2,008		
941	0,0254	0,0006	2,3622	2,3622	0,00005
	0,0258	0,0006	2,3256		
	0,0272	0,0007	2,5735		
942	0,0223	0,0004	1,7937	2,2026	0,00020
	0,027	0,0008	2,963		
	0,0227	0,0005	2,2026		

(Continua)

Amostra	Amostra Seca	Cinzas	%	Média	Desvio Padrão
95	0,0241	0,0004	1,6598	1,992	0,00005
	0,0237	0,0005	2,1097		
	0,0251	0,0005	1,992		
87P	0,1052	0,0102	9,6958	9,6958	2,73580
	0,1087	0,0068	6,2557		
	0,1096	0,0142	12,956		
88P	0,108	0,0058	5,3704	6,4579	0,62150
	0,1022	0,0066	6,4579		
	0,1097	0,0075	6,8368		

Os valores encontrados variaram de 0,70 % a 4,00 % para o colágeno de rã a partir da pele e de 6,00 % a 9,00 % para o colágeno a partir das patas de rã.

Segundo o Ministério da Agricultura (2018) e Ockerman (1994) o máximo permitido de cinzas em uma amostra de colágeno para uso industrial a partir de diferentes espécies animais, é de 2 %.

Pela tabela 8 nota-se que a variação do valor médio de cinzas para o gel de colágeno de pele de rã foi inferior a 2 % para 85% das amostras. Apesar disso, nota-se uma variação significativa do teor de cinzas (0,7 % a 2 %), esta deve-se a provável dois fatores.

A presença da pele pode ter sido um fator que levou ao aumento do teor de cinzas na amostra de gel de colágeno uma vez que o tecido é rico em minerais. O outro fator que possivelmente levou a essa variação é a ineficiência do pré tratamento com Cloreto de sódio (NaCl). A solução do composto é utilizada para a remoção de compostos solúveis (Li, 2003). Essa remoção é evidenciada pelo desprendimento da epiderme, que pode não ter sido removida em sua totalidade.

A suposta presença de resíduos da pele no gel como um fator de aumento do teor de cinzas foi comprovado pela análise das amostras 8.4 e 8.7. Elas apresentaram um teor de cinzas superior a 2 % e em suas amostras de gel nota-se a presença de uma quantidade significativa de pele residual triturada de baixa granulometria, em função de um processo de filtração ineficiente.

As amostras do grupo D, referentes ao colágeno da pata de rã apresentaram uma quantidade muito superior de cinzas quando comparada as amostras da pele de rã. Infere-se que esses valores devem-se à presença da matriz residual óssea nas patas durante o processo de pré tratamento. Esse tecido é constituído basicamente de minerais, como cálcio e fósforo. Se esses minerais não forem totalmente removidos, tornam-se resíduos na amostra de colágeno, proporcionando um aumento no teor de cinzas. Eles também podem ter proporcionado a mudança de cor do colágeno de pata liofilizado. O estudo está sendo realizado.

5.3.6 Espectroscopia de absorção na região do infravermelho com Transformada de Fourier (Do inglês Infrared spectroscopy with Fourier Transform, FTIR)

O espectro absorção na região do infravelho de uma amostra da proteína é denominado por contribuições decorrentes de vibrações dos grupos amina (GEORGE, 1991). O colágeno é formado estruturalmente como uma hélice tripla por três cadeias proteicas estendidas que envolvem uma a outra (KIM, 2006), portanto a análise de FTIR foi realizada para verificar a integridade da hélice tripla da estrutura de colágeno, identificar os principais grupos químicos presentes na estrutura e suas interações (GIL et al., 2016).

Para a realização da análise as amostras de pele e pata foram liofilizadas. A amostra de colágeno comercial (CC) - Figura 37 - já encontrava-se seca, ideal para análise. Os espectros obtidos para as amostras de colágeno de rã das peles e patas estão presentes no Anexo I.

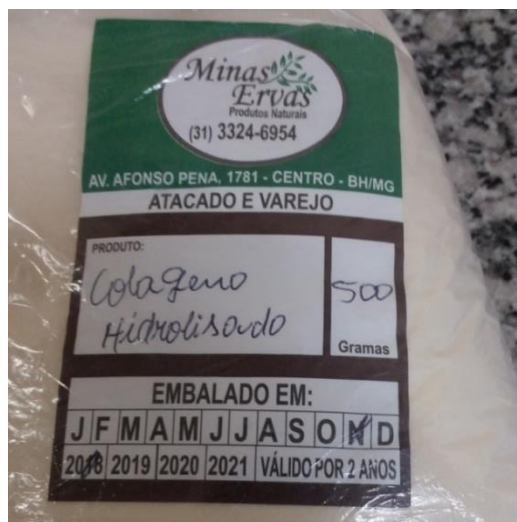


Figura 37: Registro fotográfico do colágeno comercial hidrolisado em pó (CC)

O espectro da amostra referência 8.0 está representado na Figura 38.

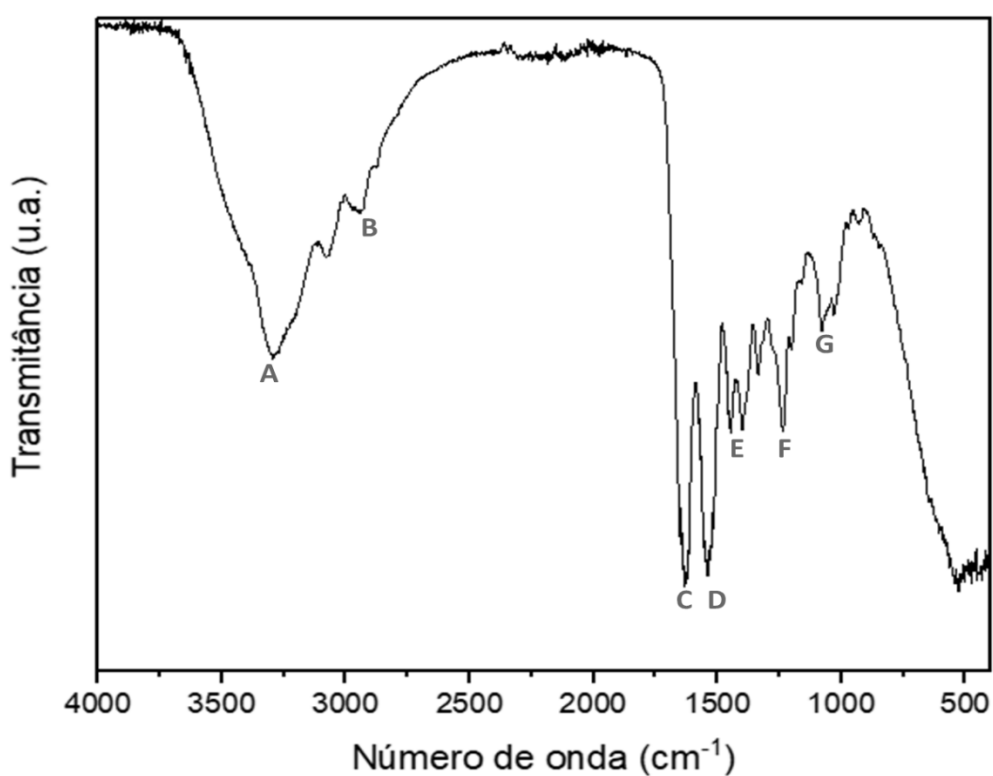


Figura 38: Espectros de absorção na região do infravermelho da amostra de colágeno de rã 8.0

O perfil do espectro obtido é característico de uma amostra de colágeno. As bandas características foram nomeadas de A a G e sua respectiva representação está espessa na Tabela 9.

Tabela 9: Representação das bandas do espectro de infravelho (Figura 41) – (RIAZ, 2018)

Letra	Número de onda	Representação
A	3290 cm ⁻¹	Amida A
B	2930 cm ⁻¹	Amida B
C	1650 cm ⁻¹	Amida I
D	1530 cm ⁻¹	Amida II
E	1450 cm ⁻¹	Vibrações dos aneis pirrolidínicos
F	1230 cm ⁻¹	Amida III
G	1030 cm ⁻¹	Deformação -N-H

A banda larga entre 3400 cm⁻¹ e 3440 cm⁻¹ é denominada Amida A e está associada às vibrações das ligações de hidrogênio ν O-H e ν N-H com o grupo carbonila da cadeia peptídica (VEERARJ, 2015). Quando o grupo N-H da cadeia peptídica está envolvida em uma ligação de hidrogênio, responsável pela estabilização da estrutura de colágeno, o que leva a redução na frequência da banda (PIELESZ, 2014). Em todas as amostras de colágeno analisadas o número de onda apresentou-se inferior a 3400 cm⁻¹, logo, a estrutura do colágeno solúvel foi estabilizada por ligação de hidrogênio com a água.

A banda em 2930 cm⁻¹, refere-se ao estiramento das ligações ν CH₃, ν CH₂ assimétricas e CH₂ simétricas da amida, denominada amida B. As bandas em 1650 cm⁻¹, 1540 cm⁻¹ e 1235 cm⁻¹ correspondem às vibrações δ C=O, δ N-H e δ C-N acoplado δ N-H (SILVESTER; YANNAS; FORBES, 1989) presentes nas estruturas das amidas I, II e III, respectivamente. A presença destas bandas indicam que a composição

das cadeias peptídicas do colágeno tipo I foram mantidas (SILVESTER; YANNAS e FORBES, 1989; RIAZ, 2018).

A presença da amida I está relacionada à estrutura secundária da proteína (VEERARJ, 2015) e a existência de ligações de hidrogênio dos grupos N-H e C=O da glicina (RIAZ, 2018). A presença de amida II no espectro de vibracional no infravermelho, correspondente à banda de número de onda na ordem de 1540 cm^{-1} , que confirma a presença da tripla hélice na estrutura (ZHANG, 2016). A amida III refere-se as interações intermoleculares do colágeno. Constituída pelo alongamento da ligação C-N, flexão N-H no plano e absorções das ligações CH_2 da Gly com as cadeiras laterais da Pro (PIELESZ, 2014)

A banda em 1450 cm^{-1} corresponde à vibração dos anéis pirrolidínicos de prolina e hidroxiprolina (Figura 42) (SILVESTER; YANNAS; FORBES, 1989; GEORGE, 1991). Em 1030 cm^{-1} , verifica-se a presença da banda que está associada às absorções de $\nu\text{C-O-C}$ apresentadas na estrutura de colágeno.

A fim de comparar, quanto aos seus grupos químicos e suas interações, os espectros das amostras dos grupos A, B, C (colágeno da pele de rã), grupo D (colágeno das patas) e o colágeno comercial (CC) de boi foram plotados – Figura 39.

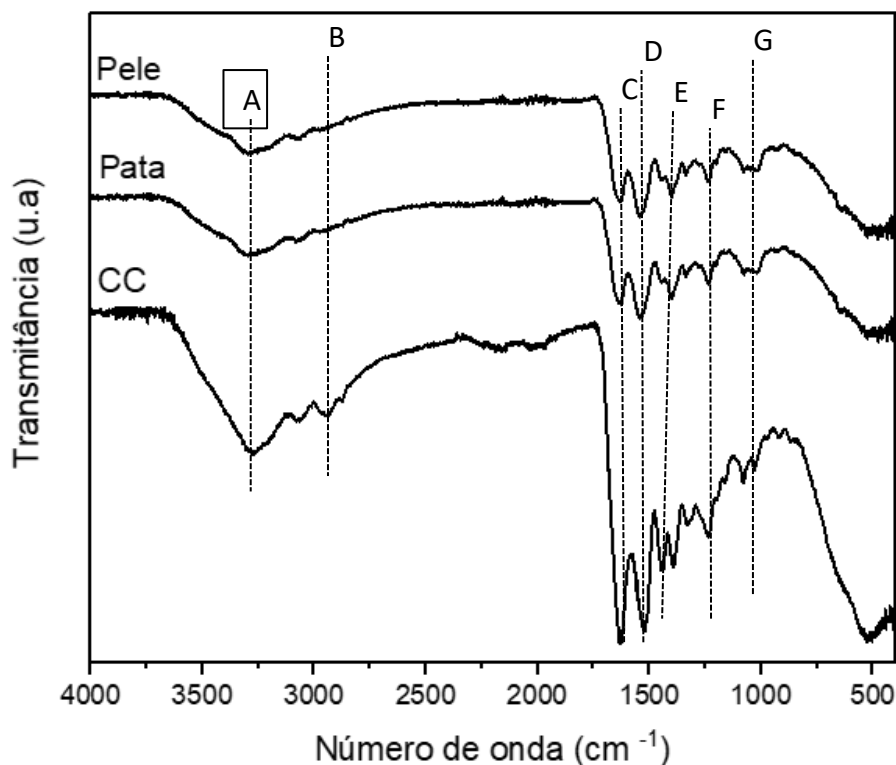


Figura 39: Espectro de infravermelho das amostras de colágeno das peles e das patas de rã liofilizadas e do colágeno comercial (CC)

Os espectros apresentaram um perfil característico dos aminoácidos das moléculas de colágeno, conforme a o perfil de bandas representado na Figura 38. Nota-se a presença das bandas associadas aos grupos aminas das amostras, mas com intensidades relativas diferentes. Essas bandas são representados pelas números de onda 3300 cm^{-1} , 2930 cm^{-1} , 1630 cm^{-1} , 1540 cm^{-1} e 1235 cm^{-1} , referente as amidas A, B, I, II e III (RIAZ,2018).

A semelhança entre eles nos permite inferir que as amostras de colágeno partindo de matérias primas diferentes apresentam em sua estrutura tipos semelhantes de grupos químicos e interações entre eles. Logo, não é possível, a partir de uma análise de FTIR determinar o tipo de matéria prima do colágeno.

As bandas características e seus respectivos número de onda estão representados na Tabela 10.

Tabela 10: Amostras de colágeno e respectivos número de onda das bandas características

Amostra	Número de onda (cm ⁻¹)						
	3400	2930	1630	1540	1450	1235	1030
8.0	3292	2935	1630	1542	1449	1236	1030
8.1	3298	2929	1632	1534	1445	1232	1028
8.2	3295	2935	1629	1540	1448	1235	1028
8.3	3296	2932	1630	1540	1450	1234	1030
8.4	3296	2934	1631	1538	1451	1235	1028
8.5	3301	2940	1630	1544	1452	1235	1030
8.6	3298	2941	1629	1541	1451	1234	1033
8.7	3295	2933	1632	1541	1448	1241	1034
9.1	3297	2934	1627	1542	1445	1235	1030
9.2	3289	2924	1634	1542	1446	1236	1027
9.31	3284	2935	1631	1544	1450	1235	1024
9.32	3294	2930	1627	1534	1445	1235	1032
9.41	3294	2934	1633	1534	1451	1236	1033
9.42	3281	2938	1635	1540	1445	1234	1034
9.5	3292	2947	1628	1542	1448	1229	1028
CC	3271	2943	1629	1523	1448	1238	1030
8.7P	3298	2970	1630	1544	1448	1235	1031
8.8P	3289	2967	1630	1541	1448	1232	1034

A partir dos valores do número de onda de cada banda percebe-se um deslocamento, de algumas bandas, para menores comprimentos de onda. Segundo Pielesz (2014), alterações nas bandas referentes as amidas I, II e III podem indicar estabilização do colágeno por ligação de hidrogênio entre a proteína e a água. Isso pode ser atribuído a efeitos de substituição ou solvente (presença de água), efeito hipsocrômico (ZHANG et al., 2017). A partir disso, pode-se concluir que o colágeno das patas e das peles de rã são mais solúveis que o colágeno comercial de boi. Além disso, infere-se que os colágenos analisados possuem uma diferença entre as interações das moléculas presentes na cadeia colagênica com a água.

Para avaliar o efeito da presença da água no perfil das bandas da amostra de colágeno, o gel de colágeno liofilizado da amostra 8.4 foi

subetido a dois diferentes processos de secagem: em Spray Dry (SD) e em Liofilizador (LI) foram analisados – Figura 40.

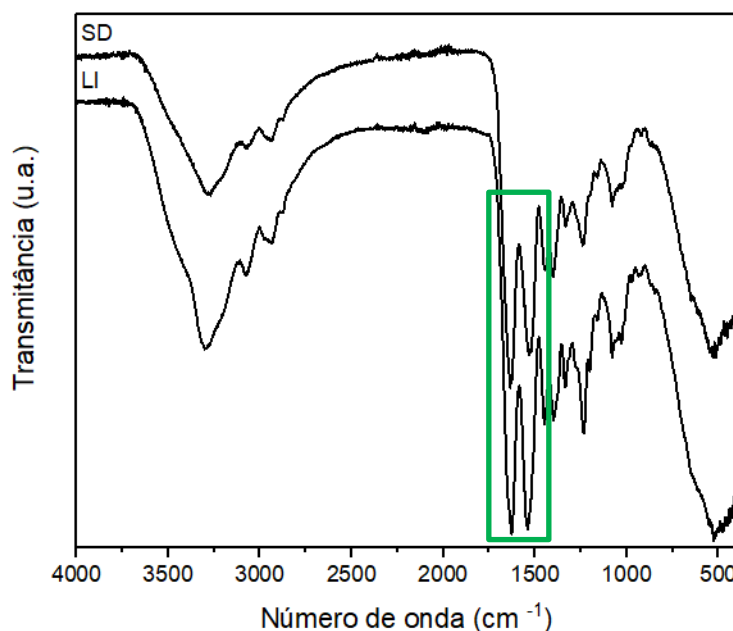


Figura 40: Espectros de FTIR da amostra de colágeno 8.4 submetida a diferentes processos de secagem

Os espectros obtidos a partir de uma mesma amostra submetida a processos de secagem diferentes apresentam o mesmo perfil de bandas, mas intensidades relativas diferentes em algumas delas. Como por exemplo as bandas em 1400 e 1450 cm⁻¹, destacadas na Figura 40. Evidenciando que a presença de água e o processo de secagem influencia na intensidade relativa das bandas de uma amostra de colágeno.

Com os espectros vibracionais no infravermelho confirma-se a suposição feita anteriormente. A partir de um espectro de infravermelho não é possível determinar a origem da amostra de colágeno usando essa técnica, uma vez que, para diferentes fontes, os espectros obtidos foram semelhantes.

Os resultados de FTIR são também utilizados para investigar a respeito da conformação helicoidal tripla do colágeno, determinado pela razão das bandas apresentadas em 1450 cm⁻¹ e 1235 cm⁻¹. Segundo a literatura, uma proporção próxima de 1,00 indica a presença de uma

estrutura helicoidal sem desnaturação, enquanto valores próximos ou inferiores a 0,50 indicam que houve desnaturação (SILVESTER, YANNAS; FORBES, 1989; GEORGE, 1991; GIL et al., 2016).

A razão entre as bandas 1235 cm^{-1} e 1450 cm^{-1} foi calculada para a amostra de colágeno das peles e das patas obtidas e para o colágeno comercial – Tabela 11.

Tabela 11: Razão entre as bandas de 1235 cm^{-1} e 1450 cm^{-1} das amostras de colágeno de rã e comercial

Amostra	Transmitância		Razão $1235\text{ cm}^{-1} / 1450\text{ cm}^{-1}$
	1450	1235	
8.0	61,96	61,84	1,00
8.1	82,61	82,28	1,00
8.2	77,69	77,42	1,00
8.3	63,85	63,52	0,99
8.4	47,68	45,87	0,96
8.5	57,14	54,94	0,96
8.6	73,39	71,85	0,98
8.7	70,21	70,90	0,99
9.1	85,80	84,76	0,99
9.2	91,40	90,54	0,99
9.31	96,40	94,70	0,98
9.32	72,90	71,19	0,98
9.41	85,95	85,57	1,00
9.42	48,05	44,93	0,94
9.5	80,51	78,05	0,97
CC	64,18	69,22	1,08
8.7P	63,83	63,69	1,00
8.8P	54,36	54,15	1,00

Os valores encontrados para a razão entre as bandas nos espectros de pele de rã, pata de rã e colágeno comercial comprovam que não houve desnaturação significativa da proteína em todas as amostras analisadas, a integridade da tripla hélice, em maior proporção, foi conservada (SILVESTER; YANNAS; FORBES, 1989; GEORGE, 1991). As variações no parâmetro entre as amostras estão dentro do erro experimental.

O espectro de absorção na região do infravermelho das amostras de colágeno obtidas a partir da pele rã dos autores Sai e Babu (2001), Li (2003), Wang (2011), Souza (2015), Zhang e Duan (2017), Karnjanapratuma (2017) e Zhao (2018) apresentaram o mesmo perfil que o colágeno obtido no trabalho em questão (Figura 38). A Tabela 12 mostra o número de onda referente as principais bandas dos trabalhos relacionados ao colágeno de rã e a sua respectiva espécie, segundo o trabalho publicado na literatura pelos autores.

Tabela 12: Comparativo do número de onda dos espectros de colágeno de rã dos trabalhos de (a) Sai e Babu (2001), (b) Li (2003), (c) Wang (2011), (d) Souza (2015), (e) Zhang, Duan (2017), (f) Karnjanapratuma (2017) e (g) trabalho em questão

Autor	Espécie	Número de onda (cm ⁻¹)						
		A	B	C	D	E	F	G
a	<i>Rana tigeriana</i>	3437	2925	1644	1554	1454	1299	1030
b	<i>Rana catesbeiana</i>	-	-	1653		1450	1235	-
c	<i>Rana catesbeiana</i>	3313	2921	1654	1548	1462	1233	-
d	<i>Rana catesbeiana</i>	-	-	1651	1560	-	1235	-
e	<i>Rana nigromaculata</i>	3429	2933	1639	1578	1417	-	1114
f	<i>Rana tigerina</i>	3296	3078	1632	1530	-	1238	-
g	<i>Rana catesbeiana</i>	3300	2922	1637	1532	1445	1235	1044

Em todos os trabalhos encontram-se semelhanças nas bandas do espectro de FTIR, com o trabalho em questão. Nota-se a ausência das interações referentes aos grupos identificados como amida A e B no colágeno extraído de rã-touro (*Rana catesbeiana*) de Li (2003) e (d) Souza (2015). Nesses casos, infere-se que as amostras analisadas possuem baixos teores de água presente nas estruturas.

5.3.7 Análise termogravimétrica (TG)

A análise de TG foi utilizada para avaliar a estabilidade térmica da amostra de colágeno liofilizada, sua temperatura de desnaturação e a perda de massa da amostra com o aumento da temperatura. As curvas termogravimétricas das amostras 8.0 e grupos A, B, C, D e o comercial (CC) estão representados nas Figuras 41 a 45.

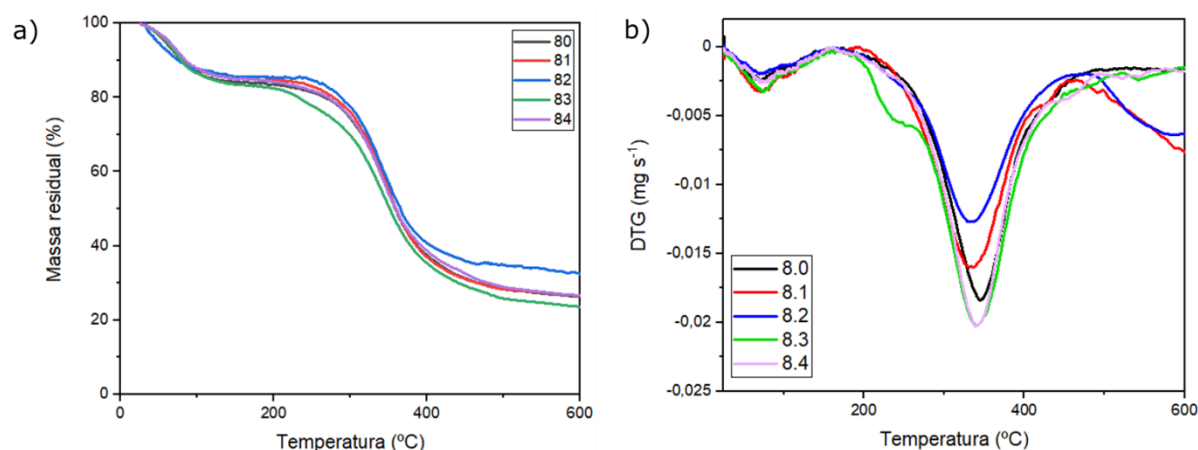


Figura 41: Curvas de a) análise termogravimétrica (TG) e b) DTG das amostras 8.0 e grupo A

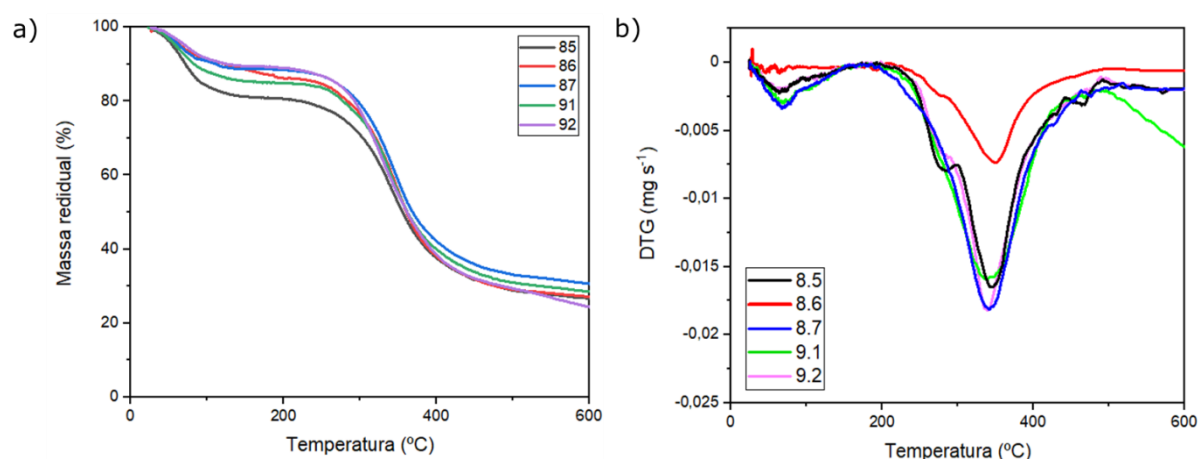


Figura 42: Curvas de a) análise termogravimétrica (TG) e b) DTG das amostras do grupo B

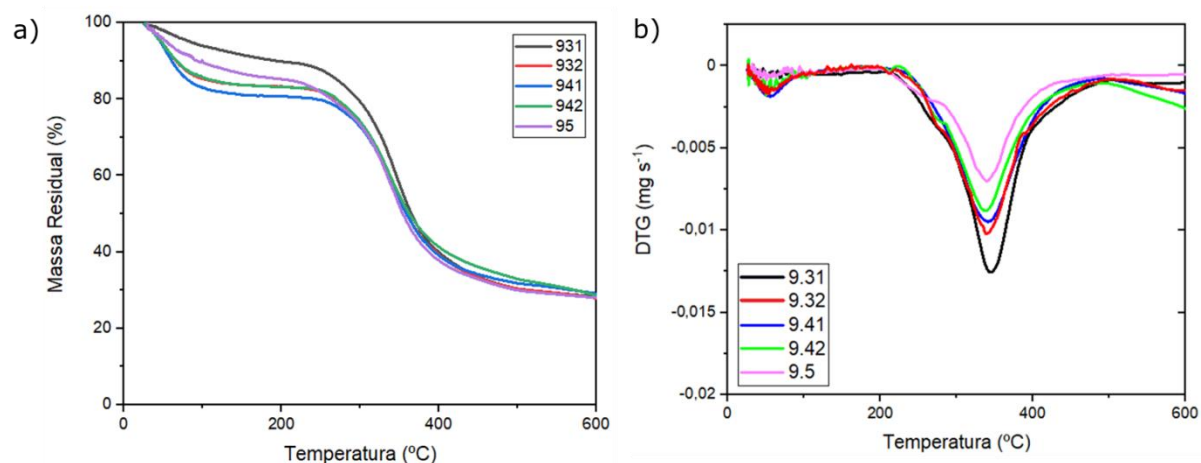


Figura 43: Curvas de a) análise termogravimétrica (TG) e b) DTG das amostras do grupo C

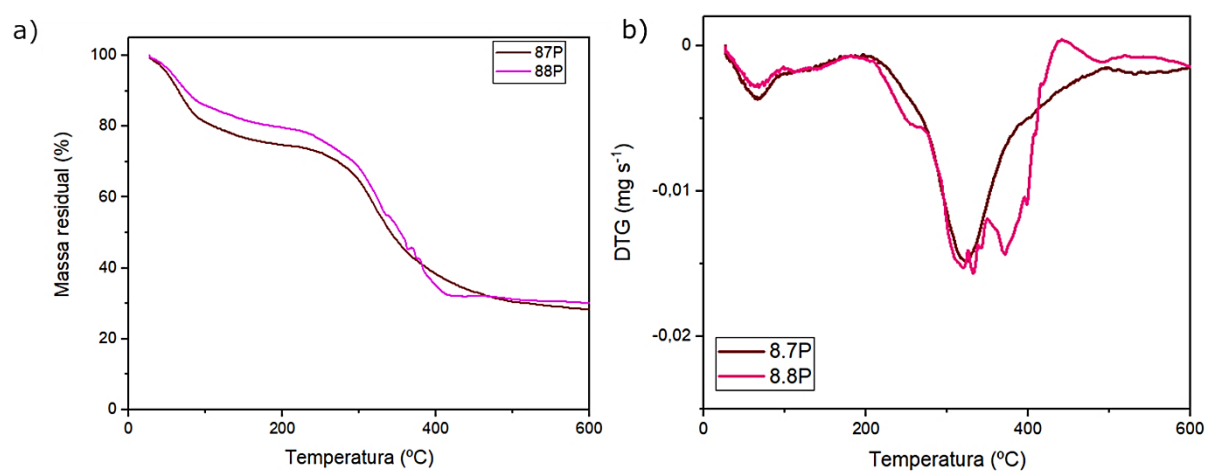


Figura 44: Curvas de a) análise termogravimétrica (TG) e b) DTG das amostras do grupo D

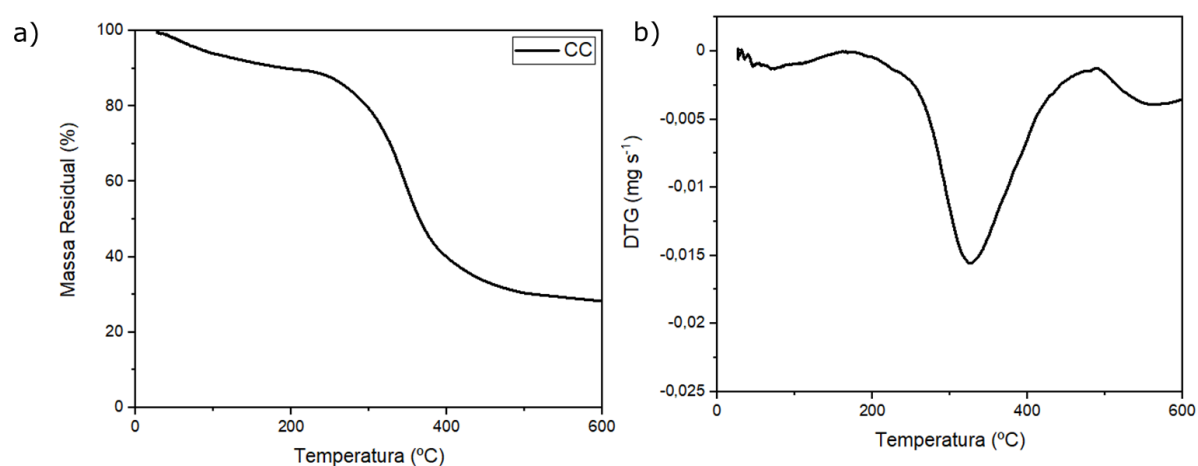


Figura 45: Curvas de a) TGA e b) DTG da amostra de colágeno comercial em atmosfera de N₂

A curva de TG de amostras de colágeno de rã-touro e colágeno comercial de boi, em atmosfera de N₂, apresentaram o mesmo perfil, onde estão evidenciados dois eventos térmicos. O primeiro estágio, referente à perda de água 25 °C a 200 °C e o segundo, com intervalo de temperatura variando entre 200 °C a 400 °C, está associado à decomposição térmica da estrutura do colágeno (SOUZA, 2015 e DING, ZHANG e LI, 2015).

Os eventos térmicos para as amostras de pele e pata e CC estão representados na Tabela 13.

Tabela 13: Temperatura inicial e final dos eventos térmicos evidenciados nas curvas da análise TermoGravimétrica

Amostra	Evento térmico I		Evento térmico II	
	T. inicial (°C)	T. Final (°C)	T. inicial (°C)	T. Final (°C)
CC	26,41	152,12	220,79	488,51
80	26,54	130,64	248,15	489,74
81	30,91	141,72	243,63	445,21
82	28,72	139,53	237,07	451,98
83	28,72	135,16	252,53	449,79
84	28,72	152,80	245,96	485,22
85	29,66	151,29	236,57	490,37
86	26,33	200,99	212,99	490,37
87	29,66	149,04	193,93	477,58
91	31,66	157,56	234,31	481,85
92	31,66	108,41	228,04	490,37
931	27,40	198,14	209,14	497,05
932	29,66	93,51	234,31	469,06
941	27,40	97,87	228,04	488,37
942	27,40	89,09	225,78	484,10
95	29,62	200,00	276,87	439,21
87P	40,35	97,40	215,00	497,00
88P	41,58	95,40	274,28	443,11

Os eventos térmicos ocorreram na faixa de 26 °C a 200 °C e 193 °C a 497 °C. Este resultado indica que o colágeno pode suportar variações térmicas até 152 °C para um colágeno comercial, 89-200 °C para um colágeno de pele de rã e de em média 96 °C para um colágeno de pata de

rã. Infere-se, pelos resultados da Tabela 13 que os colágenos analisados apresentam uma estabilidade térmica semelhante.

O perfil das curvas de TG encontrados apresentou-se semelhante ao encontrado por Souza (2015) para amostras de pele de rã da mesma espécie e por Ding, Zhang e Li (2015) e Gil et al. (2016) para colágeno extraído de boi.

Em alguns trabalhos encontrados na literatura as curvas de TG apresentam três eventos térmicos. Esses trabalhos foram realizados por Pedroso (2009), Costa (2014) e Nascimento (2016), na presença de oxigênio. Devido a escolha da atmosfera, de N₂, não é possível evidenciar um terceiro evento térmico no trabalho em questão. Uma vez que, na ausência de oxigênio, não permitindo total carbonização da amostra (TONHI, 2002).

A perda de massa dos respectivos eventos térmicos estão expressos na Tabela 14. As perdas de massas variaram na faixa de 10 a 19 % para o primeiro evento e 45 a 57 % para o segundo evento.

Tabela 14: Perdas de massa dos eventos térmicos evidenciados nas curvas da análise TermoGravimétrica

Amostra	Evento térmico I			Evento térmico II			
	Massa inicial (g)	Massa final (g)	Perda de massa (%)	Massa inicial (g)	Massa final (g)	Perda de massa (%)	Massa residual (%)
CC	8,50	7,92	6,89	7,53	2,55	66,18	26,93
80	10,16	8,60	15,36	8,29	2,93	64,67	19,97
81	11,21	9,20	17,88	9,00	4,19	53,43	28,69
82	9,35	8,10	13,39	7,84	3,86	50,75	35,86
83	12,35	10,43	15,57	9,62	3,64	62,17	22,26
84	11,16	9,53	14,63	9,20	3,33	63,78	21,59
85	11,27	9,16	18,72	8,95	3,31	63,04	18,24
86	3,74	3,22	14,00	3,22	1,10	65,79	20,21
87	9,42	8,02	14,82	7,97	2,97	62,69	22,49
91	11,46	9,60	16,23	9,47	4,08	56,97	26,80
92	9,42	8,28	12,12	8,02	2,97	62,96	24,92

Continua

Amostra	Evento térmico I			Evento térmico II			
	Massa inicial (g)	Massa final (g)	Perda de massa (%)	Massa inicial (g)	Massa final (g)	Perda de massa (%)	Massa residual (%)
931	6,07	5,45	10,33	5,45	1,85	65,99	23,68
932	5,74	4,98	13,21	4,80	1,85	61,38	25,42
941	5,79	4,85	16,33	4,68	1,88	59,85	23,81
942	5,28	4,59	13,03	4,39	1,79	59,15	27,82
95	3,70	2,88	22,09	2,88	1,25	56,77	21,13
87P	10,41	8,71	16,29	7,96	3,28	58,78	24,93
88P	10,89	9,60	11,83	8,11	3,56	56,07	32,10

A quantidade percentual de massa residual das peles, patas e CC apresentaram-se variável, o que corrobora com as variações dos resultados de teor de cinza de cada amostra. Logo, infere-se que esse aumento deve-se a presença de material inorgânico devido a presença de ossos nas patas.

A massa percentual residual foram próximas as encontradas por Tonhi (2002) (21,20 %) e Ding, Zhang e Li (2015) (22 %), para colágenos suínos e bovinos, respectivamente. E inferior ao encontrado por Pati (2010) para colágeno de peixe (32%) e por Liu *et al.* (2017) (30 %) para colágeno de boi. Apenas as amostras 8.2 e 8.8P apresentaram um teor de massa residual superior. Assim, pode-se concluir que o tipo de animal do qual o colágeno foi extraído não tem influência na quantidade percentual de massa residual, mas o meio e as condições de análise.

A presença da primeira perda de massa evidenciada nas curvas de DTG, a uma temperatura inferior a 200 °C, nos permite determinar a quantidade de água residual presente na amostra. Apesar de liofilizadas, as amostras apresentaram uma quantidade percentual de água que varia de 6,89 a 22%, sendo maior para as amostras de colágeno das pele 8.5 e 9.5 e menor para as amostras de CC.

A variação dessas perdas de massa estão atribuídas ao processo de secagem e à variação da temperatura na etapa de extração do colágeno,

que pode ter sido suficiente para uma evaporação de água maior ou menor.

Os resultados encontrados seguem a tendência esperada quando associados a variação nos valores de pH das amostras. O pH das amostras de gel das patas foi próximo ao PI do colágeno. A partir disso pode-se dizer que o colágeno das patas é pouco solúvel em água e por consequência, mais água livre haverá na amostra do gel. O que foi evidenciado na análise TG.

A suposição quanto a metodologia de secagem e sua influencia na quantidade de água residual da amostra foi evidenciada pela análise de TG da amostra 8.4 (Figura 46), submetida a dois métodos de secagem diferentes: liofilização (LI) e *spray dry* (SD). O processo foi realizado a fim de avaliar o efeito do processo de secagem e a quantidade de água presente na amostra após tal processo. A partir do resultado, é possível determinar qual processo de secagem foi mais eficiente.

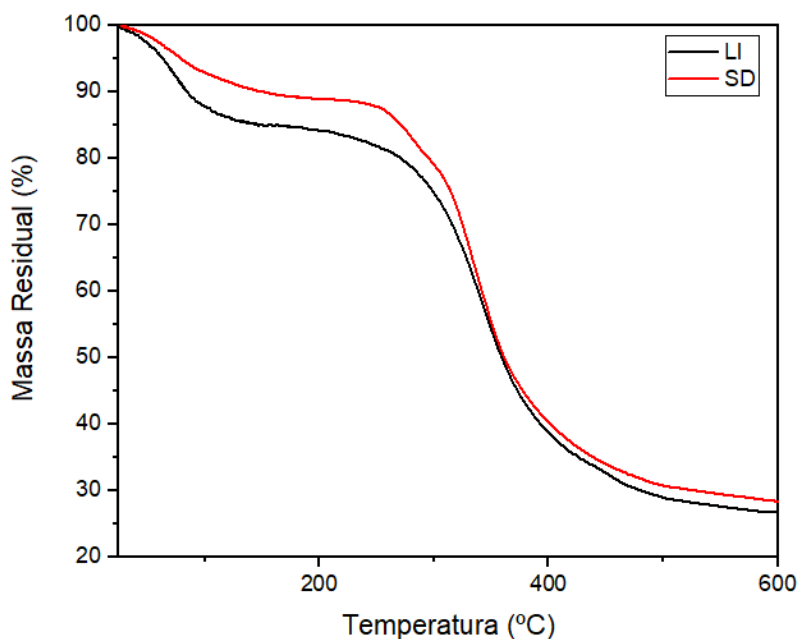


Figura 46: Curva de TG da amostra 8.4 submetida a diferentes processos de secagem: Liofilizador (LI) e *spray dry* (SD)

As curvas de TG representada na figura acima apresenta o mesmo perfil mas perdas de massa diferentes. O que nos permite inferir que o método de secagem tem influência na quantidade residual de água da

amostra. O método mais eficiente, que nos permitiu obter uma amostra mais seca, logo, mais pura, foi o SD.

A curva representada pelo método SD, em vermelho, apresenta uma primeira perda de massa percentual residual menor, logo, a amostra continha menos água livre a ser perdida. Conclui-se então que, para efeitos de aplicação, a sua escolha do método de secagem deve cautelosa e diversos métodos avaliados.

5.3.8 Calorimetria exploratória diferencial (Do inglês *Differential Scanning Calorimetry, DSC*)

A técnica de calorimetria exploratória diferencial (Do inglês *Differential Scanning Calorimetry, DSC*) foi usada para estudar o comportamento e estabilidade térmica do colágeno de pata e pele de rã e do colágeno comercial (CC). A estabilidade térmica de biopolímeros está relacionada com sua estabilidade na fabricação, armazenamento e uso (LIU *et al.*, 2017). Ela tem influência na durabilidade dos biomateriais à base de colágeno. Para isso, determina-se a Temperatura de desnaturação (Td) da amostra polimérica (NASCIMENTO, 2016).

A temperatura de desnaturação é um indicativo de estabilidade da cadeia polimérica. Quanto maior a Td, mais estável é a cadeia (LIN e LIU, 2006). As amostras de colágeno dos grupos A, B, C e D, 8.0 e CC foram avaliadas. As amostras foram submetidas a um aquecimento (0 °C a 150 °C), seguida de um resfriamento (até 0 °C).

Não foi evidenciada a Td nas curvas referentes ao primeiro aquecimento (0 °C a 150 °C) para as amostras de colágeno (CC, 8.0, 8.1, 8.2, 8.3, grupo B, C e D). Nota-se a presença de um evento exotérmico em 100 a 120 °C que refere a perda de água presa na molécula de colágeno através de ligação de hidrogênio (FERRARO *et al.*, 2016). Por sua vez, a amostra 8.4 apresentou dois resultados diferentes para os diferentes métodos de secagem: liofilização (LI) e em *spray dry* (SD).

A amostra seca por LI não apresentou evento térmico na curva de aquecimento (Figura 47), mas foi possível evidenciar uma Td's em 52 °C na curva de resfriamento (Figura 48). Enquanto para amostra seca em SD foi possível evidenciar duas Td's em 35 e 56,5 °C (Figura 49) e nenhum evento térmico no resfriamento (Figura 50), uma vez que a amostra foi totalmente desnaturada.

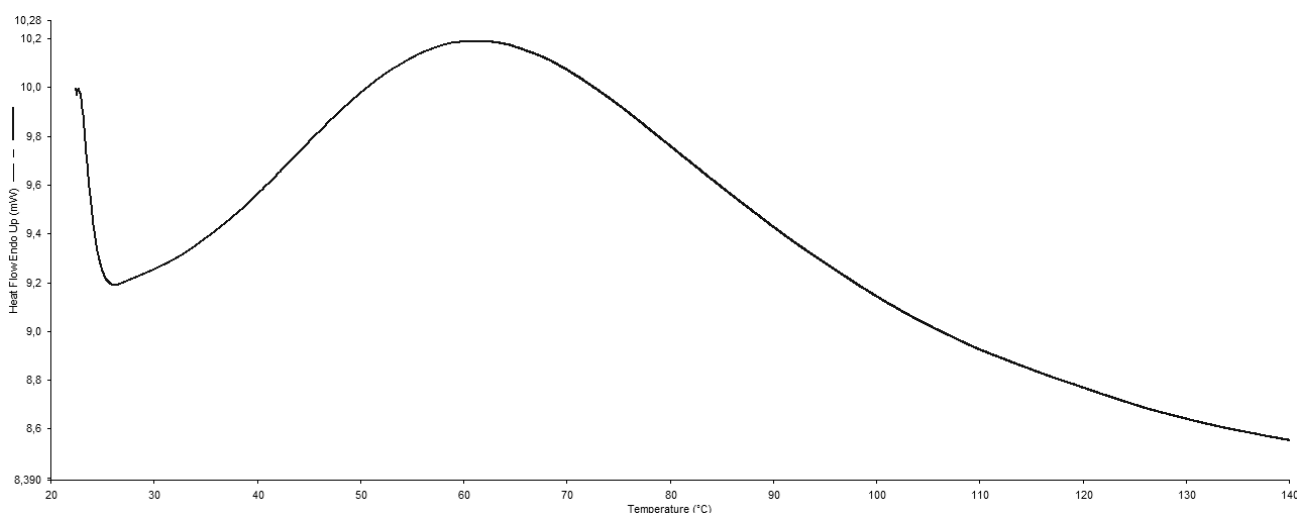


Figura 47: Curva de aquecimento da amostra de colágeno 8.4 seca em liofilizador

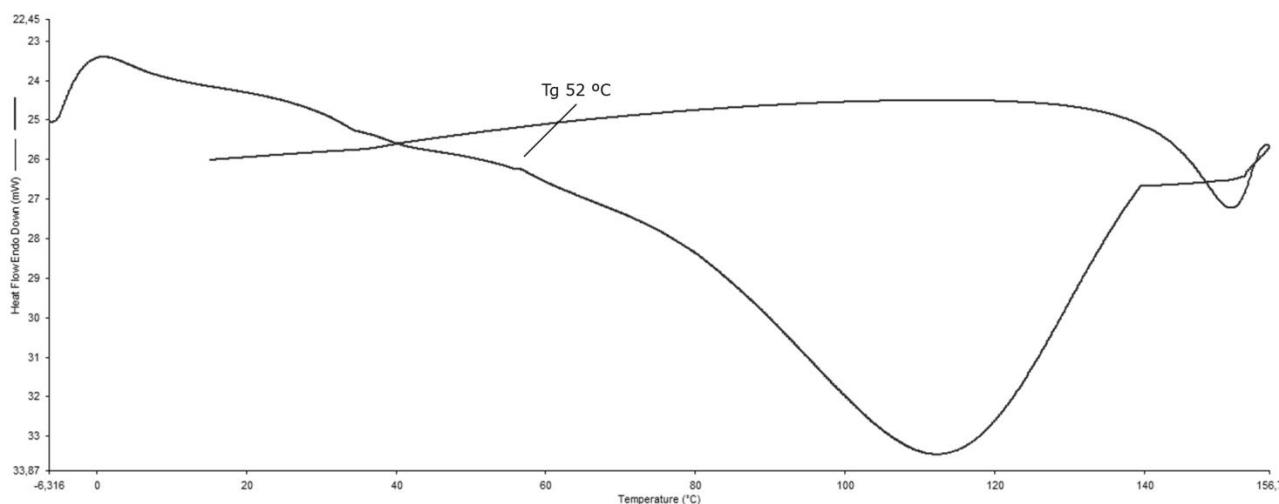


Figura 48: Curva de resfriamento da amostra de colágeno 8.4 seca em liofilizador

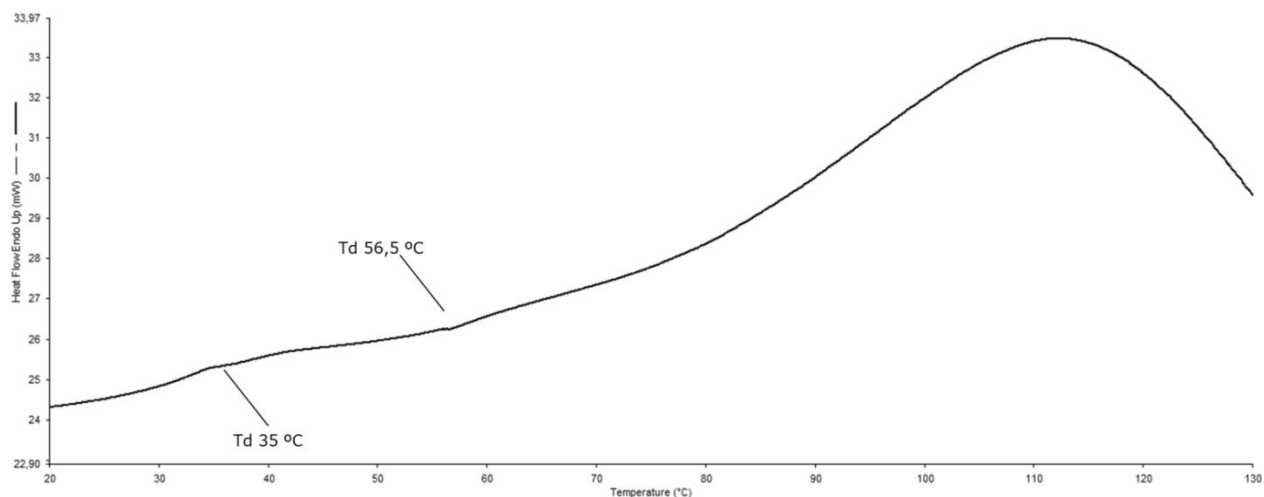


Figura 49: Curva de aquecimento da amostra de colágeno 8.4
seca em *spray dry*

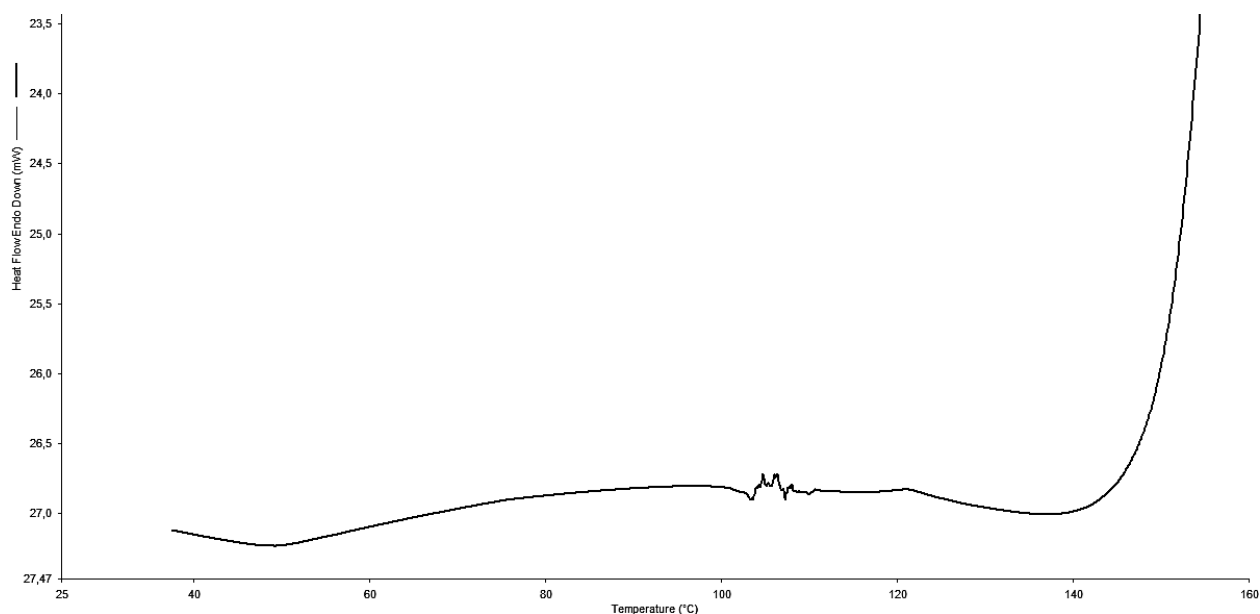


Figura 50: Curva de resfriamento da amostra de colágeno 8.4
seca em *spray dry*

As curvas de DSC das amostras 8.4 seca em liofilizador e em *spray dry* apresentam resultados que corroboram com as curvas de TG das respectivas amostras ao que se refere a presença e perda da água residual.

Na amostra com uma maior perda de massa residual de água (8.4 LI), ou seja, a que contém uma maior quantidade de água, a Td foi evidenciada no segundo evento: o resfriamento. Infere-se que o excesso

de água presente na amostra foi perdido durante o primeiro aquecimento, o que permitiu a visualização da Td no evento de resfriamento.

Enquanto a amostra seca em *spray dry* apresentou uma Td próxima, mas evidenciada no primeiro aquecimento. Logo, não houve influencia na quantidade de água presente na amostra.

Os resultados de DSC das amostras 8.4 secas a partir de métodos diferentes nos permite concluir que o comportamento térmico de colágeno depende da metodologia de secagem e consequentemente da quantidade de água residual da amostra, conforme descrito também por FERRARO, 2016.

Os valores da Td encontrados para o primeiro aquecimento da amostra 8.4 seca em *Spray dry* foi de 35 e 56,5 °C, um valor próximo as Td's encontradas por Zhao (2018) e por Li *et al.* (2004) para colágeno de rã solúvel, 33,5 e 30,3 °C, respectivamente.

Os resultados e as conclusões geradas a partir das curvas de DSC das amostras 8.4 são confirmados pelos resultados obtidos para as amostras de colágeno de pele de rã 9.31 e 8.3.

Na amostra 9.31 não foi possível evidenciar um evento térmico na curva de aqueciemnto (Figura 51), mas nota-se a presença de dois eventos térmicos na curva de resfriamento em (52 e 58 °C), referentes a Td da amostra (Figura 52). O mesmo foi evidenciado para a amostra 8.3. Na curva do de resfriamento nota-se a presença de Td em 35 °C (Figura 54), não evidenciado no primeiro aquecimento (Figura 53).

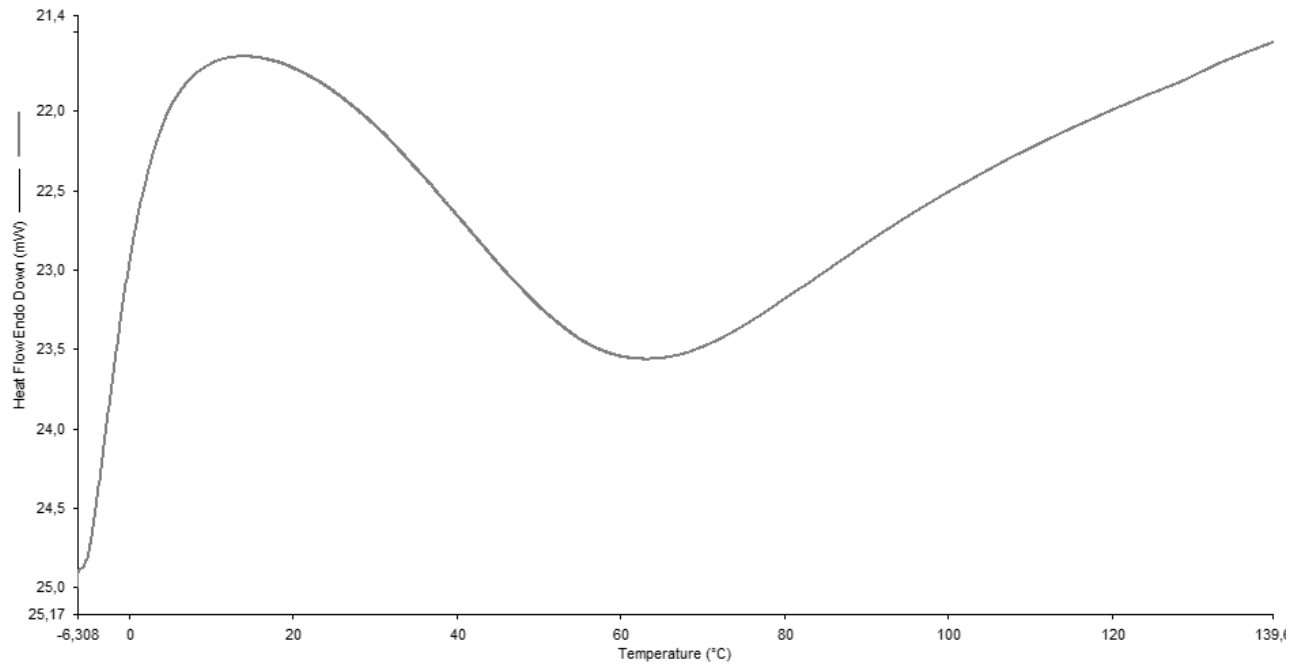


Figura 51: Curva de aquecimento da amostra de colágeno 9.31

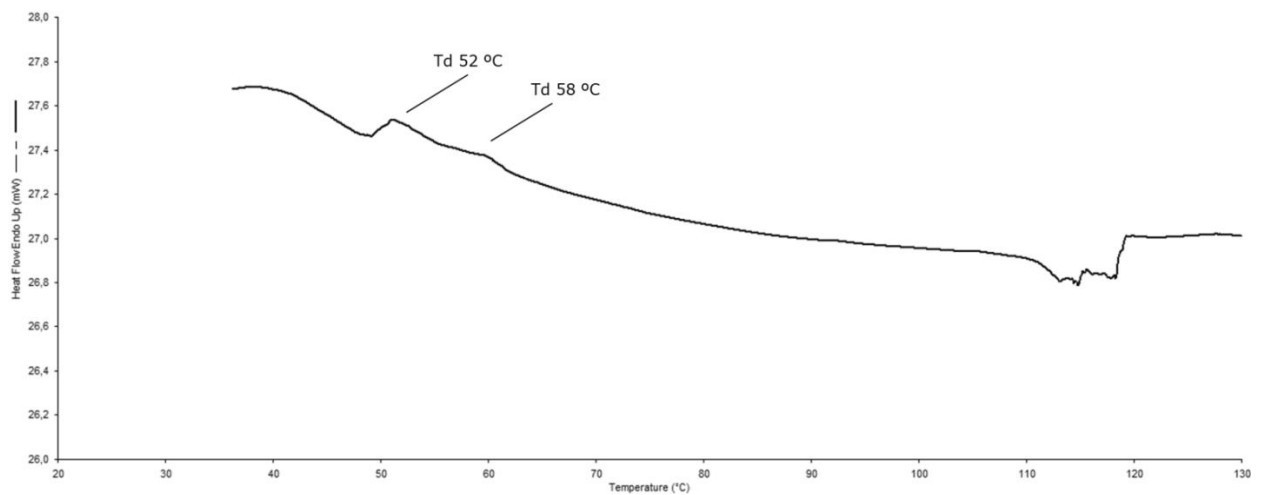


Figura 52: Curva de resfriamento da amostra 9.31

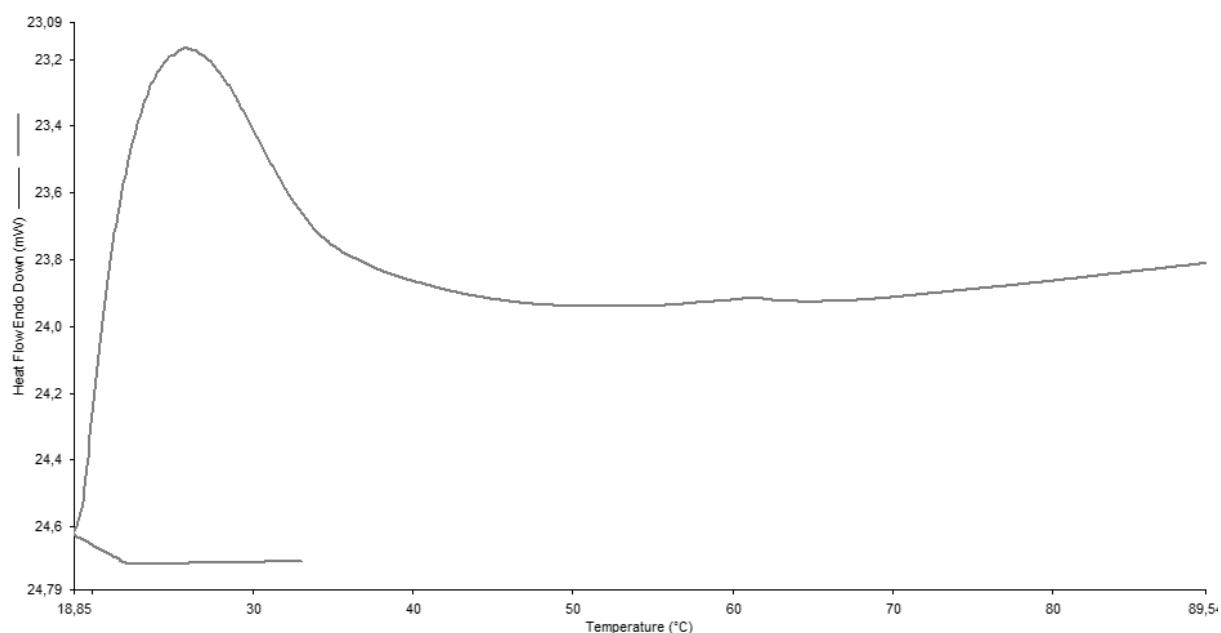


Figura 53: Curva de aquecimento da amostra de colágeno 8.3

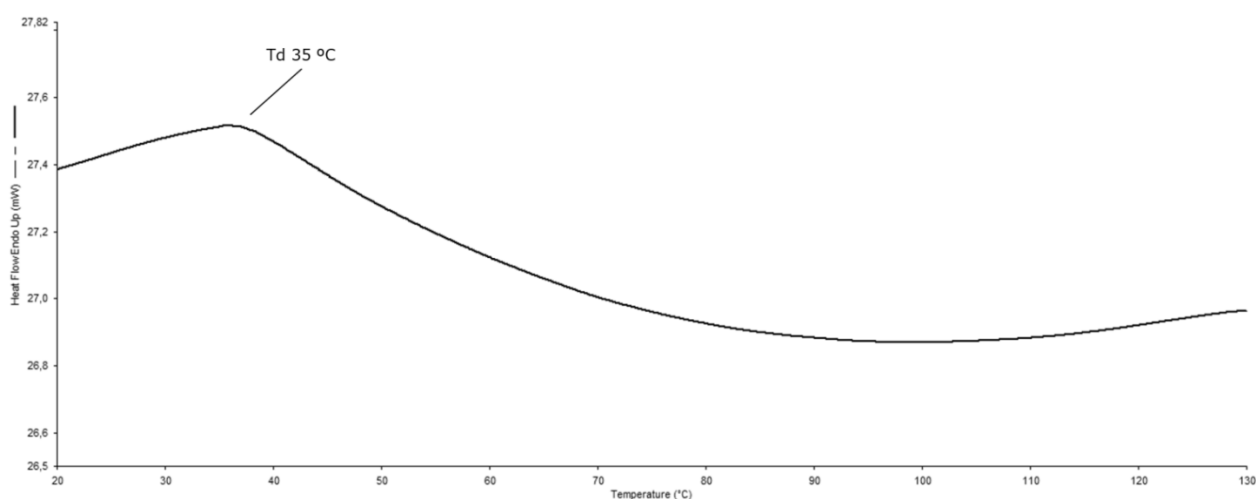


Figura 54: Curva de resfriamento da amostra 8.3

A Td encontrada na curva de resfriamento das amostras (8.3 e 9.31) assemelham-se ao valor encontrado para a amostra 8.4 seca em LI (52°C) e por Lin e Liu (2006) para colágeno de pele de sapo, 52,53 °C.

A diferença das Td está associada a diferentes condições de extração, temperatura ambiente, teor de água e cadeia de aminoácidos (ZHAO, 2018). Segundo Lin e Liu (2006) e Rosa (2007), quanto maior o teor de Pro e Hydp, mais estável é a cadeia e maior a temperatura da transição.

Em todas as amostras no qual foi possível determinar a Td, nota-se uma intensidade relativa alta da banda referente a vibração dos anéis pirrolidínicos (1450cm^{-1}) nos espectros de FTIR. Apesar disso, as demais amostras possuem a mesma elevada intensidade, não sendo este um fator determinante e diferenciável entre as amostras para determinar a Td.

Para colágeno de boi e porco, Ding, Zhang e Li (2015), Ferraro (2016) e Liu *et al.* (2017) encontraram Td's em 55, 52 e 63,5 °C, respectivamente. Segundo Zhang e Duan (2017), a Td para animais aquáticos tendem a ser menores do que para animais mamíferos (NAGAI *et al.*, 2000; ZHANG e DUAN, 2017;). A diferença encontrada na Td para diferentes tipos de animais deve-se a natureza biológica do animal em que o colágeno foi extraído e composição de aminoácidos da cadeia, uma vez que, os animais aquáticos são termosensíveis e apresentem um menor teor de Pro e Hydp em sua estrutura (LIN e LIU, 2006). Esses aminoácidos são responsáveis pela estabilidade da tripla hélice da cadeia proteica através de ligações de hidrogênio, quanto mais estável a cadeia, maior a Td (GORGIEVA, 2011).

Os resultados obtidos por DSC, nesse trabalho, para as amostras de rã estão condizentes com o esperado e corroboram as descrições da literatura.

5.3.9 Determinação do teor de colágeno por grama de gel

O teor de colágeno dos grupos de amostra de colágeno de pele e patas de rã foram determinados e estão expressos na Tabela 15. A técnica utilizada nos permite inferir a quantidade percentual de colágeno seco por grama de gel.

Tabela 15: Teor médio percentual de colágeno por grama de gel da amostra 8.0 e dos grupos A, B, C e D.

Grupo de amostras	Teor Médio (%)	D.P
8.0	2,0960	0,0329
A	2,7960	0,3320
B	3,7120	0,4059
C	4,6070	0,1909
D	2,673	0,1280

Os resultados obtidos para o teor percentual médio de colágeno variou de 2,09% a 4,60% de colágeno por grama de gel, logo a quantidade de água variou dentro de uma faixa de 95,4 a 98%, resultados condizentes com a quantidade de água adicionada no processo de extração e com os demais resultados obtidos a respeito da solubilidade e estabilidade do gel de colágeno analisado.

A quantidade de água adicionada foi suficiente para que uma maior quantidade de colágeno entrasse em contato com o meio aquecido e fosse extraído do tecido da pele e da pata de rã com uma maior eficiência, formando uma estrutura estável de colágeno, além de permitir uma estabilidade na variação da temperatura durante o processo de extração. Além disso, a quantidade de água adicionada demonstrou-se ideal para que os problemas encontrados no processo de filtração do gel fossem reduzidos.

A estabilidade da estrutura de colágeno é formada a partir das interações intermoleculares e ligações de hidrogênio, entre as moléculas de água do meio e o colágeno (PARK, 2003; SILVA, 2012; NASCIMENTO, 2016). Pode-se inferir que a hidrólise do colágeno foi favorecida pela temperatura do processo de extração (35 a 45 °C). A temperatura do processo permitiu que houvesse a quebra das ligações covalentes entre os aminoácidos da estrutura (BRANDTS, 1969; HORTN, 2018) e a formação uma estrutura helicoidal estável de colágeno hidrolisado.

A estabilidade da cadeia de colágeno é confirmada quando analisados o espectro de FTIR. O número de onda da amida A, observado nos espectros de FTIR foi um indicativo da possível estabilização do colágeno por ligação de hidrogênio com a água. (MELO FILHO, 2011).

A respeito da solubilidade tem-se como hipótese que a cadeia de aminoácidos da estrutura de colágeno apresenta uma proporção de aminoácidos com grupos hidrofílicos nas cadeias laterais elevada, uma vez a capacidade de hidratação do colágeno é alta (MELO FILHO, 2011).

A elevada solubilidade do colágeno e capacidade de retenção de água é uma característica positiva (FIGUEIRÓ, 2004) para a aplicação em cosméticos. O colágeno utilizado em produtos cosméticos devem apresentar características como capacidade de reter água, baixa capacidade alérgica e eficácia no reparo da pele danificada (HATTORI, 1998). Logo, os colágenos extraídos apresentam-se ideais para serem aplicados em cosméticos.

Para efeitos de comparação, as amostras do grupo C (9.32, 9.41 e 9.42) foram submetidas a secagem por método de liofilização e a diferença de massa seca e úmida, avaliadas. Os resultados encontrados estão expressos na Tabela 16.

Tabela 16: Teor de colágeno das amostra 9.32, 9.41 e 9.42 pelos processos de secagem em estufa (I) e liofilização (II)

Amostra	Teor I (%)	Teor médio I (%)	D.P.I	Teor II (%)	Teor médio II (%)	D.P. II
9.32	4,663	4,540	0,121	4,382	4,342	0,027
	4,555			4,331		
	4,422			4,342		
9.41	4,809	4,700	0,128	5,006	5,061	0,100
	4,708			5,200		
	4,554			5,061		
9.42	4,387	4,380	0,068	4,422	4,371	0,036
	4,417			4,371		
	4,287			4,352		

O teor de colágeno das amostras secas em estufa e liofilizadas apresentaram um teor de colágeno próximos. De acordo com Neklyudov (2003), o processo de secagem por estufa a 60 °C reduz a água em apenas 50%. A afirmação de Neklyudov não se aplica aos resultados encontrados conforme a Tabela 16 mostra. Acredita-se que a quantidade de amostra e o tempo utilizados pelo autor não foram suficientes para que a água fosse totalmente retirada.

5.3.10 Rendimento do processo extração

O rendimento do processo foi calculado a partir de uma relação matemática entre a densidade do gel, teor de colágeno por grama de gel e massa de pele utilizada no processo – eq. 6 . O que nos permitiu obter uma relação: gramas colágeno/gramas pele.

Três amostras de cada grupo foram utilizadas para determinação do rendimento médio da extração de colágeno. As extrações de colágeno das patas não apresentaram condições ideais para o cálculo do rendimento, uma vez que a massa e presença das matrizes residuais ósseas tem influência direta no cálculo.

A escolha das amostras foi feita com base em uma característica em comum: todas as peles deveriam apresentaram-se trituradas ao final do processo, permitindo que a superfície de contato colágeno-água fosse maior (SILVA, 2015). Os resultados obtidos estão expressos na Tabela 17.

Tabela 17: Rendimento médio da extração de colágeno das amostras dos grupos A, B e C

Grupo	Rendimento (g/g)	Rendimento (%)	D.P.
A	0,0126	12,64	0,5668
B	0,0135	13,5349	0,6264
C	0,01346	13,6127	0,4847
Média		13,5349	

A extração do colágeno das amostras dos grupos A e B foi realizada agitador denominado (a), nas estações de verão e inverno, respectivamente. Enquanto as extrações do colágeno do grupo C, foi realizada com o agitador (b) no período de verão.

O valor médio obtido para esse parâmetro foi de 13,53 %. Nota-se que não há uma diferença significativa entre os rendimentos obtidos a partir de diferentes agitadores. Nota-se que o desvio padrão amostral das amostra do grupo C apresentou-se menor. Logo, o agitador b apresentou-se ideal para uma extração de colágeno eficiente.

O rendimento médio dos grupos de amostras apresentou-se superior ao valor encontrados por Souza (2015) de 0,000172 g/g (*Rana castebeiana*), por Zhang e Duan (2017) (*Rana nigromaculata*), 1,83% e de Karnjanapraturm (2017) (*Rana castebeiana*) - 7,14 a 12,41 %, para uma variação de temperatura de 45 a 55 °C no processo de extração.

Tabela 18: Relação entre rendimento e temperatura

Grupo	T. final (°C)	Rendimento (%)
A	43,0	12,64
B	39,6	13,5349
C	40,3	13,6127
Média		13,5349

A Tabela 18 nos mostra uma relação entre a temperatura média dos processos de extração e a respectiva porcentagem de rendimento. Todas as temperaturas de extração apresentam-se inferiores a 45 °C (elas variaram, para todos os processos de 37 a 43 °C) e o rendimento, superior ao encontrado por Karnjanapraturm (2017). No seu trabalho, as extrações em temperaturas entre 65 e 75 °C apresentaram um rendimento de 13,78 a 15,40 %.

O colágeno é uma proteína sensível ao aquecimento. Portanto, condições de temperatura, alteração da superfície, concentração salina e ácida, desidratação e tempo imerso em solução são fatores que podem

levar à desnaturação proteica (MELO FILHO, 2011). Soluções alcalinas não solubilizam colágenos reticulados, levando a um baixo rendimento e teor de pureza em pH elevados (FERRARO, 2017). Além disso, a espécie do animal pode permitir variações no rendimento do processo (KIM, 2006).

No processo de extração de rã-touro proposto por Souza (2015), o tempo que a pele foi embebida em ácido acético (0,5 M) foi de 72 h; 24 vezes maior que o tempo proposto neste trabalho. O que poderia ter levado a quebra das estruturas de colágeno e baixo rendimento.

Para eficiência do processo, testes com diferentes condições de tempo, temperatura e a concentração das soluções foram avaliadas e testadas de forma a obter um maior rendimento. A massa por pele de rã utilizada variou entre 26 e 33 g. Desta forma, a quantidade de colágeno por rã, pela metodologia proposta, foi de 0,315 a 0,446 g por rã.

5.3.11 Determinação de proteínas totais por método de Kjeldahl

Para avaliar o teor de proteína total determinou-se a quantidade de nitrogênio total (NT) presente nas amostras pelo método de Kjeldahl. Ao final do processo de digestão da amostra nota-se uma mudança de coloração: durante a digestão a amostra apresenta-se marrom e ao final do processo, verde translúcido (Figura 55).



Figura 55: Fotografia do bloco digestor contendo a amostra de colágeno após a digestão

Ao adicionar a solução de NaOH 40% m/v à amostra digerida, percebe-se a mudança coloração para marrom. Porém, quando há excesso de água na amostra, sua coloração é azul, conforme ilustrado na Figura 56.

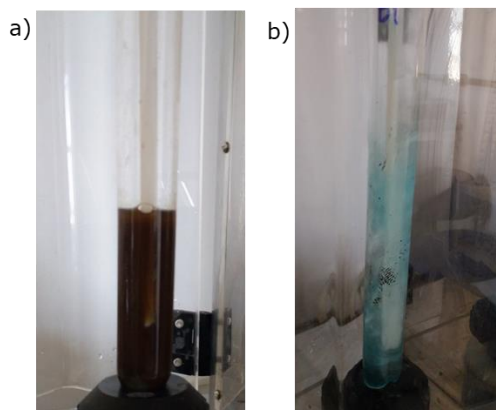


Figura 56: Fotografia do tubo contendo as amostras após adição de NaOH 40% m/v a) amostras com quantidade de água ideal b) amostra com quantidade de água em excesso

Depois de destilada a amostra é titulada com HCl 0,1 mol.L⁻¹, sua coloração passa de verde a rosa, Figura 57, e o volume de HCl gasto determinado.



Figura 57: Fotografia das amostra de colágeno antes da titulação (verde) e após titulada com HCl 0,1 mol.L⁻¹ (rosa)

Na Tabela 19 estão descritos os teores de proteína bruta (PB) para as amostras de colágeno obtidas da pele de rã-touro, obtidos a partir dos cálculos descritos nas equações 2 e 3.

Tabela 19: Quantidade de Nitrogênio total (NT) e proteína bruta (PB) média das amostras de colágeno em gel liofilizadas dos grupos A, B, C e D, pede e pata *in natura* e amostra 8.0

Amostra		NT (%)	PB (%)	D.P.
Pele	Natural	2,63	15,01	0,0000
8.0	Liof.	9,26	52,83	0,0000
A	Liof.	13,54	77,21	10,230
B	Liof.	10,13	57,76	8,6675
C	Liof.	9,25	52,76	7,9871
Pata	Natural	0,25	1,44	0,0000
D	Liof.	9,765	55,69	2,5951

O teor de proteína das peles de rã (*Rana castebeiana*) foi de 15%, muito próximo ao encontrado por Tümerkan (2019) (14,6%) para rãs da espécie *Rana esculanta*.

As amostras foram analisadas e nota-se que o teor de PB médio total foi próximo de 50 %. As amostras do grupo A, apesar de apresentarem um teor médio de PB maior que as demais, apresentaram uma maior variação entre os valores, não sendo representativas.

As extrações das amostras do grupo B e C, das peles de rã, foram realizadas em estações diferentes (inverno e verão), mas sob o mesmo tipo de controle de temperatura: ar condicionado. De acordo com os resultados e a afirmação feita por Pati, Adhikari e Dhara (2010) de que “o controle da temperatura na primeira etapa da extração é fundamental para que a estrutura do colágeno permaneça íntegra”, infere-se que o controle da temperatura foi eficiente, mas o tipo de controle escolhido, não ideal.

O controle da temperatura utilizando ar condicionado permitiu que a temperatura permanecesse constante durante o processo de pré tratamento. Mas o equipamento não levou a redução da temperatura o suficiente para um processo de tratamento e extração eficientes.

Tabela 20: Teor de Nitrogênio Total (NT) e Proteína Bruta (PB) para as amostras de colágeno dos grupos A, B, C e D, e a amostra 8.0

Amostra		NT (%)	PB (%)
Pele	Natural	2,63	15,01
8.0	Liof.	9,26	52,83
8.1	Liof.	13,84	78,91
8.2	Liof.	13,46	76,75
8.3	Liof.	10,06	57,39
8.4	Liof.	13,62	77,66
8.5	Liof.	11,76	67,05
8.6	Liof.	12,14	69,24
8.7	Liof.	10,00	57,01
9.1	Liof.	8,36	47,68
9.2	Liof.	10,13	57,76
9.31	Liof.	9,25	52,76
9.32	Liof.	9,16	52,25
9.41	Liof.	8,12	46,30
9.42	Liof.	9,79	55,80
9.5	Liof.	12,47	71,11
Pata	Natural	0,25	1,44
87P	Liof.	9,44	53,85
88P	Liof.	10,09	57,52

Dentre as amostras analisadas, todas possuem teor de proteína bruta superior ao encontrado por Bordignon (2012) para pele de Tilápia do Nilo congeladas (31,8 %), Veeruraj (2015) – 31,79 % para pele de Lula, por Zhang e Duan (2017) – 24,30% - para Rã da espécie *Rana nigromaculata* e por Ferraro (2017) para fêmur e tíbia de boi (30%). Mas inferior ao encontrado por Wolf (2007) para pó e fibra de colágeno bovino (85,61 %) e por Tümerkan (2019) (77,8%) para rãs da espécie *Rana esculanta*.

A hipótese que se tem para a diferença no teor de PB encontrada nas amostras refere-se a temperatura durante o processo de tratamento e extração em que as amostras foram submetidas. Uma vez que a

temperatura interfere diretamente na integridade da estrutura de colágeno e no processo eficiente de remoção de compostos indesejados.

As amostras que apresentaram um maior teor de PB apresentam características em comum, como: presença de peles trituradas no processo de extração, baixa variação de temperatura e baixa temperatura nos processos de tratamento da pele.

Para obtenção de melhores resultados de PB de colágeno da pele de rã sugere-se que o tipo de controle da temperatura no processo de tratamento seja reavaliado e modificado. Além do ajuste do pH final do gel, para neutro/alcalino, uma vez que o colágeno precipita a elevados pH's (Li et al., 2020) e mudanças no processo de filtração das amostras, buscando obter a maior quantidade de produto final.

Para o teor de PB do colágeno das patas, devido a presença de ossos, propõe-se que as patas sejam moidas. Por consequência, a superfície de contato solução-amostra nos processos de tratamento e extração irá aumentar, permitindo que um maior teor de colágeno seja extraído.

6. CONCLUSÃO

A metodologia de extração proposta para obtenção de colágeno tipo I a partir dos resíduos nobres da rã: pele e pata apresentou-se eficiente e reprodutível.

O processo possibilitou a obtenção de dois produtos, gel e filme. Ambos os produtos obtidos apresentaram características favoráveis para sua aplicação industrial: textura, cor, solubilidade, pH, cinzas, ângulo de contato e temperatura de desnaturação.

O pH dos géis apresentaram-se inferiores ao ponto isoelétrico do colágeno para todas as amostras de colágeno de pele e pata. Isso levou a um inchaço do gel e maior fixação da água na estrutura.

A presença de osso no processo de extração do colágeno a partir das patas levou a um teor de minerais fixos (cinzas) superior a 2 % e ao encontrado para as peles. Apenas as amostras de pele 8.4 e 8.7 apresentaram teor de cinzas superior a 2 %, devido ao processo de filtração não eficiente.

O tempo médio de absorção de uma gota de água no filme de colágeno foi de 1h:30min. O ângulo de contato para todos os filmes analisados foi inferior a 90 °, o que nos permite caracterizar o filme como hidrofílico.

O ensaio de tração uniaxial nos permite caracterizar o filme como plástico. Os filmes analisados apresentaram resultados melhores do que encontrados na literatura para aplicação industrial, acredita-se que seja devido ao tamanho e estabilidade da cadeia devido a presença de água.

O espectro de absorção na região do infravermelho apresentou bandas características de uma amostra de colágeno para todas as amostras analisadas. O espectro de patas, peles e CC apresentaram um perfil semelhante das bandas, mas as intensidades relativas das bandas características de colágeno diferentes. Essa diferença nos permite inferir que a ordem e teor de aminoácidos da cadeia peptídica é diferente para as diferentes amostras.

As curvas de TG e DSC apresentaram-se semelhantes ao encontrado na literatura para amostras de colágeno de rã. A curva de TG apresentou

duas perdas de massa nas faixas 25 a 200 °C e 200 a 600 °C referentes a perda de água e decomposição térmica da estrutura do colágeno, respectivamente. A Td encontrada foi de 35 e 56,5 °C.

A amostra 8.4 foi submetida a diferentes métodos de secagem: Liofilização e *spray dry*. Os processos de secagem nos permitiram obter diferentes quantidades de água na amostras o que levou a diferentes resultados de TG e DSC. A curva de TG apresentou-se semelhante, mas a massa da primeira perda diferente. A amostra seca por *spray dry* apresentou uma quantidade inferior do que a amostra liofilizada. Apenas a amostra seca por *spray dry* apresentou Td.

As amostras liofilizadas 8.3 e 9.31 apresentaram Td de 35 e 52 / 58 °C, respectivamente, na etapa de resfriamento. A presença da Td nessas amostras deve-se a quantidade de água fixa presente nas mesmas serem inferiores a das demais amostras.

O teor de PB das amostras de pele de rã foi de 15 %, conforme encontrado na literatura. As amostras de colágeno apresentaram um teor de PB de 46 a 79 %. O teor de PB encontrado apresenta-se superior ao encontrado para tilápia, inferior ao encontrado para bovinos e dentro da faixa de PB encontrada para colágeno de rã.

O valor encontrado para o rendimento médio foi de 0,0135 g/g. Este apresenta-se dentro da faixa encontrada na literatura para diferentes espécies de rã e superior ao encontrado por Souza (2015) para mesma espécie e país de origem.

Os resultados encontrados nos permitiram inferir que o colágeno obtido através da metodologia de extração proposta apresenta uma qualidade superior ao encontrado para rãs de mesma espécie e mesmo país de origem. O local de criação do animal e as condições de temperatura e umidade durante o processo de extração foram fatores que influenciaram no sucesso do resultado.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALBERTS, Bruce et al. **Molecular Biology of the Cell**. New York: Garland Science, 2002.
- ALFARO, Alexandre da Trindade et al. Characterization of wami tilapia (*Oreochromis niloticus*) skin gelatin: microbiological, rheological and structural properties. **Food Science and Technology International**, 20, 5, 373-381, 2013.
- ARGELINI, Ana Paula Ribeiro. **QUANTIFICAÇÃO DO COLÁGENO, DA COMPOSIÇÃO CENTESIMAL E ESTUDO DO BALANÇO DE MASSA DOS NUTRIENTES DECLARADOS, NA AVALIAÇÃO DA QUALIDADE DE SALSICHAS**. 2011. 92 f. Tese (Doutorado) - Curso de Farmácia, UFMG, Belo Horizonte, 2011.
- ARVANITOYANNIS, I. Unpublished data. Department of Agricultura. Crop and animal production, School of Technological Science, University of Thessalia, Nea Ioni, Magnesia, Greece, 1999.
- ASTM D638-14, Standard Test Method for Tensile Properties of Plastics, ASTM International, West Conshohocken, PA, 2014.
- AYRES, Athos Alexandre Cesnik et al. Carcass yield and proximate composition of bullfrog (*Lithobates catesbeianus*). **Acta Scientiarum. Animal Sciences**, 37, 4, 329-334, 1 out. 2015.
- BAREL, A. O.; PAYE, M.; MAIBACH, H.I. **Handbook of Cosmetic Science and Technology**. New York: Marcel Dekker, 2001.
- BAZAZ, R. M.; MASHREGHI, M.; MAHDAVI SHAHRI, N.; ASOODEH, A.; BEHNAM RASSOULI, M.; GOLMOHAMMADZADEH, S. **Pharmaceutical application of frog skin on full-thickness skin wound healing in mice**. *Pharmaceutical Biology*, v. 51, n. 12, p. 1600-6, 2013.
- BORDIGNON, Adriana Cristina et al. Utilization of frozen and salted Nile tilapia skin for batch-processed gelatin extraction. **Revista Brasileira de Zootecnia**, Maringá, v. 41, n. 3, p.473-478, jan. 2012.
- BRANDTS, J. F., Conformational transition of protein in water and in aqueous mixtures. In: *Structure and Stability of Biological*

Mocromolecules, S. N. Timasheff and G. D. Fasman, editors, p. 213 – 290. Marcel Dekker, New York, 1969

BRANDTS, John F.; HUNT, Linda.. Thermodynamics of protein denaturation. III. Denaturation of ribonuclease in water and in aqueous urea and aqueous ethanol mixtures. **Journal Of The American Chemical Society**, [s.l.], v. 89, n. 19, p.4826-4838, set. 1967. American Chemical Society (ACS).

CALLISTER, W. D. **Ciência e engenharia dos materiais**. 5. ed. p. 327 – 357. Rio de Janeiro: Ltc, 2002.

CHAUDRY, Zahra F et al. Preparação e caracterização de colágeno aniônico por hidrólise seletiva de grupos carboxamida internos. **Polímeros**, [s.l.], v. 7, n. 2, p.40-46, jun. 1997. FapUNIFESP (SciELO).

CHEN, Zonggang et al. Mechanical properties of electrospun collagen–chitosan complex single fibers and membrane. **Materials Science And Engineering: C**, [s.l.], v. 29, n. 8, p.2428-2435, out. 2009. Elsevier BV.

COSTA, Marianna de Oliveira da. **ESTUDO DA DEGRADAÇÃO “IN VITRO” DO COMPÓSITO 3-D HIDROXIAPATITA/COLÁGENO TIPO I SOB CONDIÇÕES ESTÁTICA E DINÂMICA**. 2014. 69 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Engenharia Metalúrgica e de Materiais, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2014.

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

DEISENHOFER, J. Proteins. **Current Opinion In Structural Biology**, [s.l.], v. 11, n. 6, p.701-702, 1 dez. 2001. Elsevier BV.

DELLA TORRE, J.C.M., BARAQUET, N. J., *Composição centesimal e teor de colágeno em carne bovina moída*. **Revista Instituto Adolfo Lutz**, 64(2). Campinas – SP, 2005

DING, Cuicui; ZHANG, Min; LI, Guoying. Preparation and characterization of collagen/hydroxypropyl methylcellulose (HPMC) blend film. **Carbohydrate Polymers**, [s.l.], v. 119, p.194-201, mar. 2015. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.carbpol.2014.11.057>.

FALCÃO, Suyiene Cordeiro et al. Pele de Rana Catesbeiana como curativo biológico oclusivo no tratamento de feridas cutâneas produzidas em cães: Alterações macroscópicas e microscópicas resultantes da interação desses tecidos. Estudo preliminar. **Acta Cirurgica Brasileira**, p.151-159, maio 2002. FapUNIFESP (SciELO).

FERRARO, Vincenza et al. Collagen type I from bovine bone. Effect of animal age, bone anatomy and drying methodology on extraction yield, self-assembly, thermal behaviour and electrokinetic potential. **International Journal Of Biological Macromolecules**, 97, 1, 55-66, 2017.

FERREIRA, Ana Marina et al. Collagen for bone tissue regeneration. **Acta Biomaterialia**, 8, 9, 3191-3200, 2012.

FERREIRA, D.S., et al. Caracterização histológica da pele da Rã-touro (*Rana Catesbeiana*, Shaw 1802), Universidade Federal Rural de Pernambuco, 68, 239-243, 2006.

FIGUEIRÓ, S.D.; GÓES, J.C., MOREIRA, R.A.; SOMBRA, A.S.B. On the physicochemical and dielectric properties of glutaraldehyde crosslinked galactomannan-collagen films. **Carbohydrate Polymers**, v. 56, p. 313-320, 2004.

GELSE, K. Collagens—structure, function, and biosynthesis. **Advanced Drug Delivery Reviews**, [s.l.], v. 55, n. 12, p.1531-1546, 28 nov. 2003. Elsevier BV.

GEORGE, Anne; VEIS, Arthur. FTIRS in water demonstrates that collagen monomers undergo a conformational transition prior to thermal self-assembly in vitro. **Biochemistry**, [s.l.], v. 30, n. 9, p.2372-2377, mar. 1991. American Chemical Society (ACS)

GIL, Camila S. B.; GIL, Viviane S. B.; CARVALHO, Sandhra M.; SILVA, Gisele R.; MAGALHÃES, Juliana T.; ORÉFICE, Rodrigo L.; MANSUR, Alexandra; MANSUR, Herman S.; PATRICIO, Patrícia S. O.; OLIVEIRA, Luiz C. A.. Recycled collagen films as biomaterials for controlled drug delivery. **New Journal Of Chemistry**, [s.l.], v. 40, n. 10, p. 8502-8510, 2016. Royal Society of Chemistry (RSC).

GOISSIS, A.P.A. **Análise estrutural do colágeno tipo I. Correlação estrutural: atividade biológica.** 112 f. Dissertação (Mestrado em Bioengenharia) – Escola de Engenharia de São Carlos/Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto/ Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2008

GORGIEVA, Selestina; KOKOL, Vanja. Collagen- vs. Gelatine-Based Biomaterials and Their Biocompatibility: Review and Perspectives. **Biomaterials Applications For Nanomedicine**, [s.l.], p.2-40, 16 nov. 2011. InTech.

GUDMUNDSSON, M.; HAFSTEINSSON, H. Gelatin from cod skins as affected by chemical treatments. **Journal of Food Science**, v. 62, p. 37–39, 1997.

HALLA, Nouredine et al. Cosmetics Preservation: A Review on Present Strategies. **Molecules**, [s.l.], v. 23, n. 7, p.1571-1632, 28 jun. 2018. MDPI AG.

HATTORI, Shunji. Natural Polymers. Collagen. Molecular Assemble and its Application. Kobunshi, [s.l.], v. 47, n. 6, p.394-397, 1998. Society of Polymer Science, Japan.

HORTN, M. M., Martins, V. C. A., Fernandes, Y. O. M., Vulcani, V. A. S., & Plepis, A. M. G. *Development and characterization of collagen/gelatin films and gels incorporated with pequi oil.* **Journal of Applied Polymer Science**, 135(33), 46627. 2018.

HUANG, Yu-ru et al. Isolation and characterization of acidand pepsin-solubilized collagens from the skin of balloon fish (Diodonholocanthus). **Food Hydrocolloids**, 25, 6, 1507-1513, 2011.

INSTITUTO ADOLFO LUTZ. **Normas Analíticas do Instituto Adolfo Lutz.** V.I: Métodos químicos e físicos para análise de alimentos, 3 ed. São Paulo: IMESP, 1985. P.44-45

KARJANAPRATUM, S., Sinthusamran, S., Sae-leaw, T., Benjakul, S. & Kishimura, H.Characteristics and Gel Properties of Gelatin from Skin of Asian Bullfrog (Ranatigerina). *Food Biophysics*, 12, 289. 2017

KEMPKA, A. P. et al. UTILIZAÇÃO DA CALORIMETRIA EXPLORATÓRIA DIFERENCIAL (DSC) PARA AVALIAÇÃO DA DESNATURAÇÃO TÉRMICA DE DIFERENTES COLÁGENOS BOVINOS. **Anais do XX Congresso Brasileiro de Engenharia Química**, [s.l.], p.1-8, fev. 2015. Editora Edgard Blücher.

KIM, Se-kwon; MENDIS, Eresha. Bioactive compounds from marine processing byproducts – A review. **Food Research International**, [s.l.], v. 39, n. 4, p.383-393, maio 2006. Elsevier BV.

KUMAR, K. V. Sathya Sai; SAI, K. Purna; BABU, M.. Application of frog (*Rana tigerina* Daudin) skin collagen as a novel substrate in cell culture. **Journal Of Biomedical Materials Research**, [s.l.], v. 61, n. 2, p.197-202, 6 maio 2002.

KWANSA, Albert Lawrence; FREEMAN, Joseph W.; VITA, Raffaella de. **Molecular Dynamics and Mechanical Behavior of Collagen Type I and its Lysine/Hydroxylysine-derived Crosslinks**. 2013. 138 f. Tese (Doutorado) - Curso de Biomedical Engineering, Faculty Of The Virginia Polytechnic Institute And State University, Virginia, 2013.

LEE, C. H.; SINGLA, A; LEE, Y. Biomedical applications of collagen. *International journal of pharmaceutics*, 221, 1-2, 1-22, 19 2001.

LEHNINGER, A.L.; NELSON, D.L.; COX, M.M. **Princípios de Bioquímica**. 3. ed. São Paulo: Sarvier, 2000. 839p.

LEÓN-LÓPEZ, Arely et al. Hydrolyzed Collagen—Sources and Applications. **Molecules**, [s.l.], v. 24, n. 22, p.4031-4047, 7 nov. 2019. MDPI AG.

LI, H et al. Studies on Bull frog skin collagen. **FoodChemistry**, 84, 1, 65-69, 2003.

LI, Po-hsien et al. Extraction and characterization of collagen from sea cucumber (*Holothuria cinerascens*) and its potential application in moisturizing cosmetics. **Aquaculture**, [s.l.], v. 515, p.734590-734598, jan. 2020. Elsevier BV.

LIN, Yung Kai; LIU, Deng Cheng. Comparison of physical-chemical properties of type I collagen from different species. **Food Chemistry**, [s.l.], v. 99, n. 2, p.244-251, jan. 2006. Elsevier BV.

LIU, Ting et al. A novel combined polyphenol-aldehyde crosslinking of collagen film—Applications in biomedical materials. **International Journal Of Biological Macromolecules**, [s.l.], v. 101, p.889-895, ago. 2017.

LIU, Yu-xin et al. Effect of endogenous cysteine proteinases on structures of collagen fibres from dermis of sea cucumber (*Stichopus japonicus*). **Food Chemistry**, 232, 10-18, 2017.

LODISH, Harvey et al. **Molecular Cell Biology**. New York: W. H. Freeman, 2000.

MELLO, Silvia Conceição Reis Pereira et al. Bacteriological and physical-chemical characteristics evaluation of bullfrog's (*Rana catesbeiana*) back and leg meat obtained from processing plant. **R. Bras. Ci. Vet.**, Niterói, v. 13, n. 3, p.151-154. 2006.

MELO FILHO, Arthur Bibiano de; VASCONCELOS, Margarida Angélica da Silva. **Produção Alimentícia: Química dos alimentos**. p. 53 – 57. E-tec Brasil, Pernambuco, 2011.

MERCANTE, Cacilda Thais Janson et al. Bullfrog (*Lithobates catesbeianus*) farming system: water quality and environmental changes. **Acta Limnologica Brasiliensia**, [s.l.], p.9-17, mar. 2014. FapUNIFESP (SciELO)

Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. "Métodos **Físico Químicos** para Análise de Alimentos" / Ministério da Saúde, Agência Nacional de Vigilância Sanitária. – Brasília: Ministério da saúde, 2005.

MORAES, Marisa Correa de. **Produção de Hidrolisados de Colágeno Visando Diferentes Aplicações Tecnológicas**. 2012. 120 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2012.

MORAWETZ, Herbert. Rate of Conformational Transitions in Biological Macromolecules and their Analogs. **Advances In Protein Chemistry**, 243-277, 1972.

MOREIRA, Cheisy Daiana Freitas. **Avaliação da adição de colágeno tipo I e nanopartículas de vidro bioativo a hidrogéis termossensíveis de quitosana para uso na engenharia de tecido**. 2014. 91 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Engenharia Metalúrgica, Materiais e de Minas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2014.

MOUSSA, Asmaa El Haj et al. Characterization of Anuran Skin Peptides: An Alternative to the Classical Therapeutic Agents Used for MDR Pathogens. **International Journal Of Currit Microbiology And Applied Sciencies**, Lebanon, v. 4, n. 10, p.889-900, jan. 2015.

MOW, van C.; HUNG, Clark T. Biomecânica da Cartilagem Articular. In: MOW, van C. **Biomecânica Básica**. 3. ed. São Paulo: Guanabara, 2003. Cap. 3. p. 51-85.

Muyonga, J.H., Cole C.G.B. & Duodu, K.G. Extraction and physicochemical characterization of Nile perch (*Lates niloticus*) skin and bone gelatin. **Food Chemistry**, 86, 325-332. 2004.

NAGAI, T. Isolation of collagen from fish waste material — skin, bone and fins. **Food Chemistry**, [s.l.], p.277-281, 15 feb. 2000. Elsevier BV.

NAGAI, Takeshi et al. Collagen of edible jellyfish exumbrella. **Journal Of The Science Of Food And Agriculture**, [s.l.], v. 79, n. 6, p.855-858, 1 maio 1999. Wiley.

NASCIMENTO, Daniel Luis do. **Preparo e caracterização de biomateriais de colágeno e gelatina com adição de resina de jatobá**. 2016. 50 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Química, Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 2016.

NEKLYUDOV, A. D.. Nutritive Fibers of Animal Origin: Collagen and Its Fractions as Essential Components of New and Useful Food Products. **Applied Biochemistry And Microbiology**, [s.l.], v. 39, n. 3, p.229-238, 2003. Springer Science and Business Media LLC.

NEKLYUDOV, A. D.. Nutritive Fibers of Animal Origin: Collagen and Its Fractions as Essential Components of New and Useful Food Products. **Applied Biochemistry And Microbiology**, [s.l.], v. 39, n. 3, p.229-238, 2003.

NORMAH,I; AFIQAH, Maidzatul, M. Effect of extraction time on the physico-chemical characteristics of collagen from sin croaker (Johniecop sina) waste. **International Food Research Journal**. Shah Alam, p. 1074-1080. Jun. 2018.

OAKENFULL, D.; PEARCE, J.; BURLEY, R. W. Protein gelation. In: Damodaran, S.; Paraf, A. (Eds.) Food proteins and their applications. Marcel Dekker: New York, cap.4, p.111-142, 1997.

OCKERMAN, H. W.; HANSEN, C. L. **Industrialización de subproductos de origem animal**. Zaragoza: Acribia, 1994. 387 p

OLIVEIRA, Vagne de Melo et al. Collagen: general characteristics and production of bioactive peptides - a review with emphasis on byproducts of fish. **Actafish**, 2, 5, 56-68, 2017.

PAL, G. K.; NIDHEESH, T.; SURESH, P.V. Comparative study on characteristic sand in vitro fibril formation ability facid and pepsin soluble collagen from the skin of catla (Catlacatla) and rohu (Labeorohita). **Food Research International**, 76, 804-812, 2015.

PARK, J. B., BRONZINO, J. D. Park J B Biologic Materials: Tissue Derived Biomaterials (Collagen). In PARK, J. B., BRONZINO, J. D. Biomaterials: Principles and Applications v.2, Boca Raton, 2003

PARK, Sung Hee; JO, Yeon-ji. Static hydrothermal processing and fractionation for production of a collagen peptide with anti-oxidative and anti-aging properties. **Process Biochemistry**, [s.l.], v. 83, p.176-182, ago. 2019. Elsevier BV.

PATI, Falguni; ADHIKARI, Basudam; DHARA, Santanu. Isolation and characterization of fish scale collagen of higher thermal stability. **Bioresource Technology**, [s.l.], v. 101, n. 10, p.3737-3742, maio 2010. Elsevier BV.

PAYNE, K. J.; VEIS, A.. Fourier transform ir spectroscopy of collagen and gelatin solutions: Deconvolution of the amide I band for conformational studies. **Biopolymers**, [s.l.], v. 27, n. 11, p.1749-1760, nov. 1988.

PEDROSO, Maitê Goinellu Vanella. **Estudo comparativo do colágeno hidrolisado e comercial com adição de PVA**. 2009. 71 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Química Analítica, Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 2009.

PIELESZ, Anna. Temperature-dependent FTIR spectra of collagen and protective effect of partially hydrolysed fucoidan. **Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, [s.l.], v. 118, p.287-293, jan. 2014. Elsevier BV.

PIGNATELLO, Rosario (Ed.). **Biomaterials Applications for Nanomedicine**. Croatia: Intech, 2011.

PRESTES, Rosa Cristina et al. Caracterização da fibra de colágeno, gelatina e colágeno hidrolisado. **Revista Brasileira de Produtos Agroindustriais**, Campina Grande, 15, 4, 375-382, 2013.

PRESTES, Rosa Cristina. Colágeno e Seus Derivados: Características e Aplicações em Produtos Cárneos. **Journal Of Health Sciences**, 15, 1, 65-74, 2012.

Regulamento técnico sobre identidade e requisitos mnimos de qualidade da gelatina. Ministério da Agricultura - Minuta de RTIQ da Gelatina e Colágenos (8747818) / art. 219 do Capítulo IV do anexo da Portaria nº 562 de 11 de abril de 2018

RIAZ, Tehseen et al. FTIR analysis of natural and synthetic collagen. **Applied Spectroscopy Reviews**, [s.l.], v. 53, n. 9, p.703-746, mar. 2018. Informa UK Limited.

ROÇA,R.O. Composição química da carne (<http://www.fca.unesp.br/Home/Instituicao/Departamentos/Gestaoetecnologia/Teses/Roca102.pdf>). Botucatu: FCA-UNESP, 2012 (artigo técnico).

RODRIGUES, Ana P. H. et al. Control of properties of nano compositesbio-based collagen and cellulose nano crystals. **Cellulose**, 24, 4, 1731-1744, 22 2017.

RODRIGUES, Ana Pacheli Heitmann; SOUZA, Sâmara Durães de; GIL, Camila Silva Brey; PEREIRA, Fabiano Vargas; OLIVEIRA, Luiz Carlos Alves de; PATRICIO, Patrícia S. de Oliveira. Biobased nanocomposites based on collagen, cellulose nanocrystals, and plasticizers. **Journal Of Applied Polymer Science**, Belo Horizonte, v. 134, n. 25, p. 1-9, 2 mar. 2017.

RODRIGUEZ, A. E. I. **Extrato de pele de Rã Catesbeiana, composto e método para tratar a mastite em bovinos**. Depositante: Afonso Enrique Islas Rodriguez. Procurador: Demarest e Almeida Advogados – Almeida Rotenberg e Boscoli – Sociedade de advogados. 2009

ROSA, Rubens dos Santos. **Avaliação morfológica do colágeno após aquecimento induzido in vivo**. 2007. 99 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Bioenergia, Universidade Federal do São Carlos, São Carlos, 2007.

SAI, K Purna; BABU, Mary. Studies on Rana tigerina skin collagen. **Comparative Biochemistry And Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology**, [s.l.], v. 128, n. 1, p.81-90, jan. 2001. Elsevier BV.

SASAKI, N. ODAJIMA, S. Stress-strain curve and Young's modulus of a collagen molecule as determined by the X-ray diffraction technique. **Journal Biomechanics**.**29 (5)** 655-658. 1996.

SCHMITZ, V. U.; BANDEIRA, D. F.; ESQUERDO, V. M.; FEISTHER, V. A.; PINTO, L. A. A. Propriedades físicas de gelatina obtidas a partir de cabeças de corvina. 2013

SEIXAS FILHO. J. T., PEREIRA. M. M. e MELLO. S. C. R. P. Manual de Ranicultura para o Produtor. P. 155. HP Comunicação Editora . Rio de Janeiro, 2017

SILVA, T. F.; PENNA, A. L. B.. Colágeno: Características químicas e propriedades funcionais. **Instituto Adolfo Lutz**, São José do Rio Preto, 71, 3, 530-539, 2012.

SILVESTER, M. F.; YANNAS, I. V.; FORBES, M. J. Collagen banded fibril structure and the collagen platelet reaction. *Thrombosis Research*, 55, 135-148, 1989.

SOUZA, D. J.; CESCA, K.; PORTO, L. M. *Incorporação de colágeno de rã em membranas de celulose bacteriana/Aloe Vera*. **Blucher Chemical Engineering Proceedings**, 1, 2, 250-256, 2015.

TONHI, Edivan; PLEPIS, Ana Maria de Guzzi. Obtenção e caracterização de blendas colágeno-quitosana. **Química Nova**, 25, 6, 943-948, 2002.

TRINDADE, Lucas Carvalho. **Simulação computacional do efeito da pressão sobre a enzima pectina metilesterase do tomate**. 2018. 121 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Física, Universidade Federal do Espírito Santo, Vitória, 2018.

TÜMERKAN, Elif Tuğçe Aksun et al. Physiochemical and functional properties of gelatin obtained from tuna, frog and chicken skins. **Food Chemistry**, [s.l.], v. 287, p.273-279, jul. 2019. Elsevier BV.

UCKO, David. **Química para as ciências da saúde**. São Paulo: Manole, 2007. 660 p.

VARGAS, D.M.; AUDÍ, L.; CARRASCOSA, A. Peptídeos derivados do colágeno: novos marcadores bioquímicos do metabolismo ósseo. **Revista da Associação Médica Brasileira**, 43, 4, 367-370, 1997.

VEERURAJ, Anguchamy et al. Isolation and characterization of collagen from the outer skin of squid (*Doryteuthis singhalensis*). **Food Hydrocolloids**, [s.l.], v. 43, p.708-716, jan. 2015. Elsevier BV.

VINARDI, A. R. **Efeito do Ultra-som de baixa intensidade no colágeno da pele sadia de ratos**. 2007. 106 f. Tese (Doutorado) - Curso de Bioenergia, Universidade Federal do São Carlos, São Carlos, 2007.

WANG, T. et al. Type I collagen from bullfrog (*Rana catesbeiana*) fallopian tube. **African Journal Of Biotechnology**, [s.l.], v. 10, n. 42, p.8414-8420, 8 ago. 2011. Academic Journals.

WEIR, C. E. Rate of shrinkage of tendon collagen-heat, entropy, and free energy of activation of the shrinkage of untreated tendon. Effect of acid, salt, pickle and tannage on the activation of tendon collagen. **J. AM. Leather Chem Assoc.**, v. 44, p. 108 – 140. 1949

WOLF, K. L. Propriedades físico-químicas e mecânicas de biofilmes elaborados a partir de fibra e pó de colágeno / Kleber Luís Wolf. - São José do Rio Preto : [s.n], 2007.

YOUSEFI, M.; ARIFFIN, F.; HUDA, N. An alternative source of type I collagen based on by-product with higher thermal stability. **Food Hydrocolloids**, 63, 372-382, 2017.

ZEUGOLIS, D.i.; RAGHUNATH, M.. Collagen: Materials Analysis and Implant Uses. **Comprehensive Biomaterials**, [s.l.], p.261-278, 2011. Elsevier.

ZHANG, J.; DUAN, R. Characterization of acid-soluble and pepsin-solubilised collagen from frog (*Rana nigromaculata*) sk. **International Journal Of Biological Macromolecules**, 101, 638-642, 2017.

ZHANG, Junjie et al. Characterisation of acid-soluble and pepsin-solubilised collagen from jellyfish (*Cyanea nozakii* Kishinouye). **Food Chemistry**, [s.l.], v. 150, p.22-26, maio 2014.

ZHANG, Qiang et al. Comparison of collagen and gelatin extracted from the skins of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) and channel catfish (*Ictalurus punctatus*). **Food Bioscience**, [s.l.], v. 13, p.41-48, mar. 2016. Elsevier BV.

ZHANG, Yanzhong et al. Electrospinning of gelatin fibers and gelatin/PCL composite fibrous scaffolds. **Journal Of Biomedical Materials Research**, [s.l.], v. 72, n. 1, p.156-165, 2004. Wiley.

ZHAO, Y et al. Extraction and characterization of collagen hydrolysates from the skin of *Rana chensinensis*. **3 Biotech**, [s.l.], v. 8, n. 3, p.178-181, mar. 2018. Springer Science and Business Media LLC.

ZHOU, Cunshan et al. Extraction and characterization of chicken feet soluble collagen. **Lwt**, [s.l.], v. 74, p.145-153, dez. 2016. ZOU, Ye et al. Effect of ultrasound pre-treatment on the characterization and properties of collagen extracted from soft-shelled turtle (*Pelodiscus sinensis*). **Lwt - Food Science And Technology**, 82, 72-81, 2017.

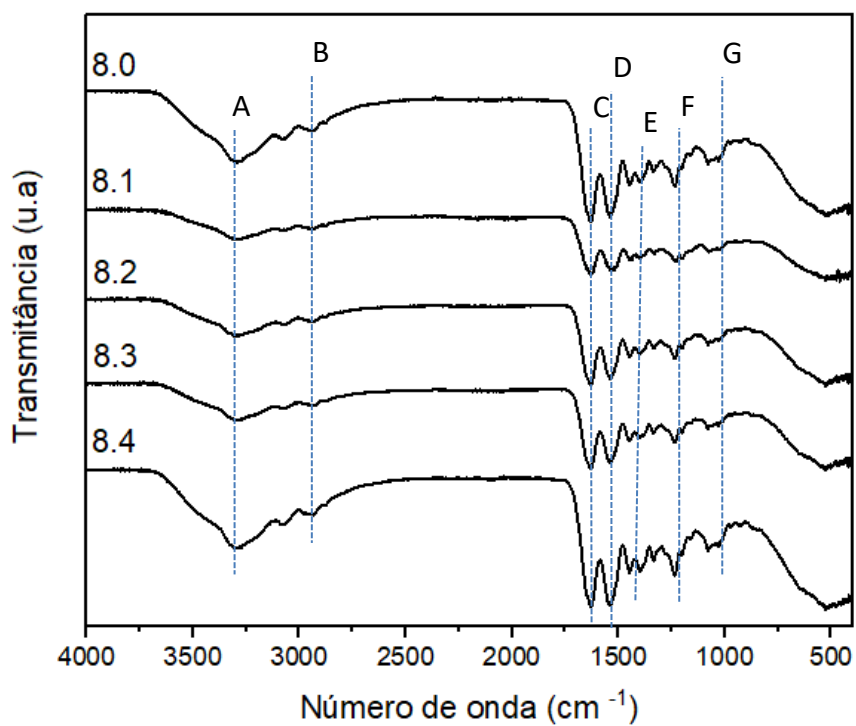
ANEXO I

Figura 58: Espectros de absorção na região do infravermelho das amostras 8.0 e grupo A

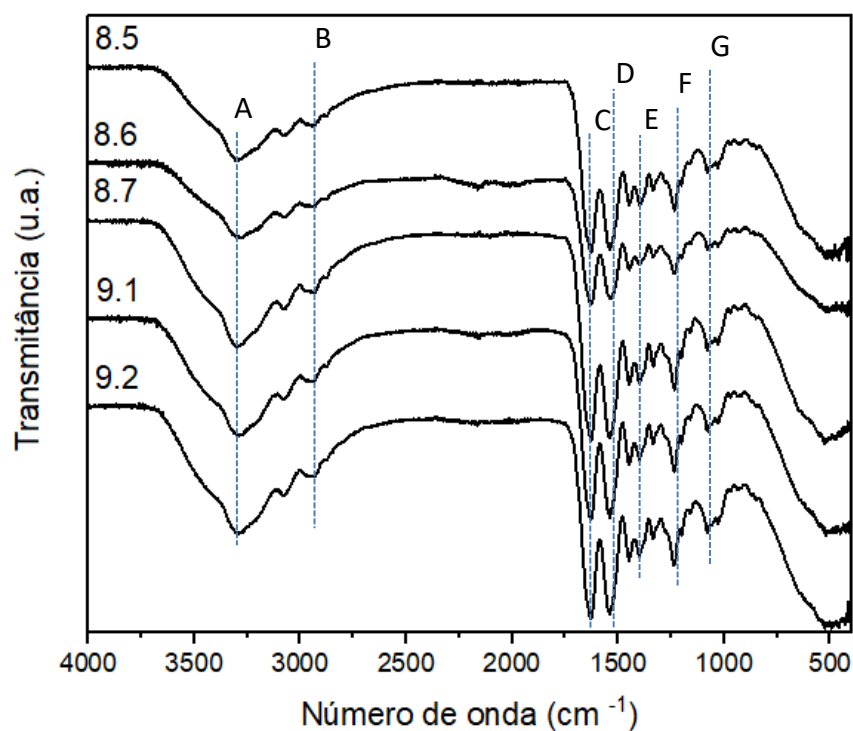


Figura 59: Espectros de absorção na região do infravermelho das amostras do grupo B

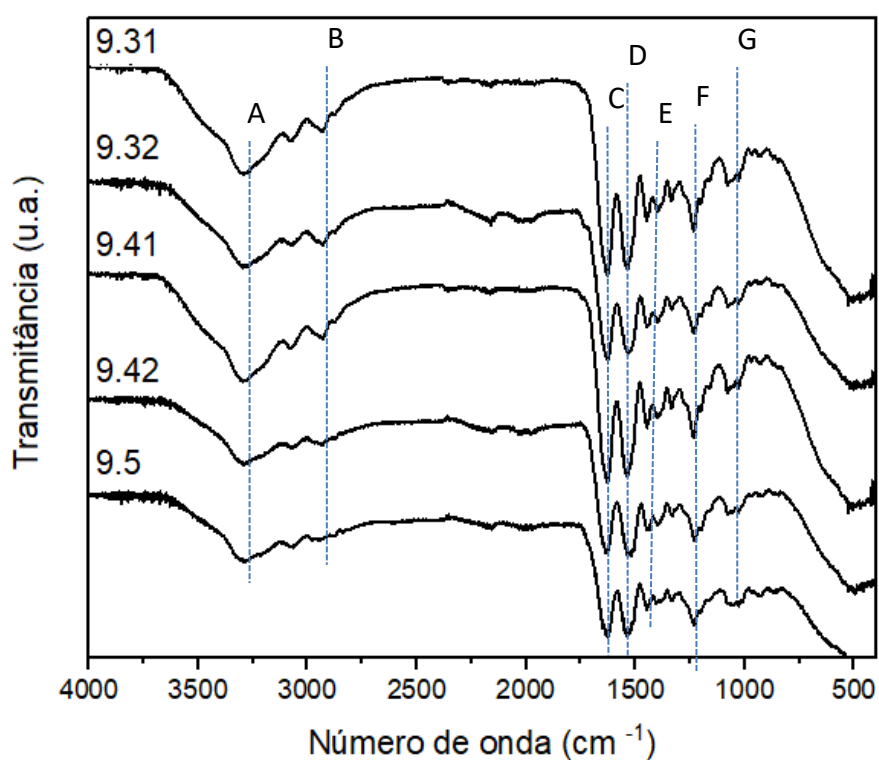


Figura 60: Espectros de absorção na região do infravermelho das amostras do grupo C

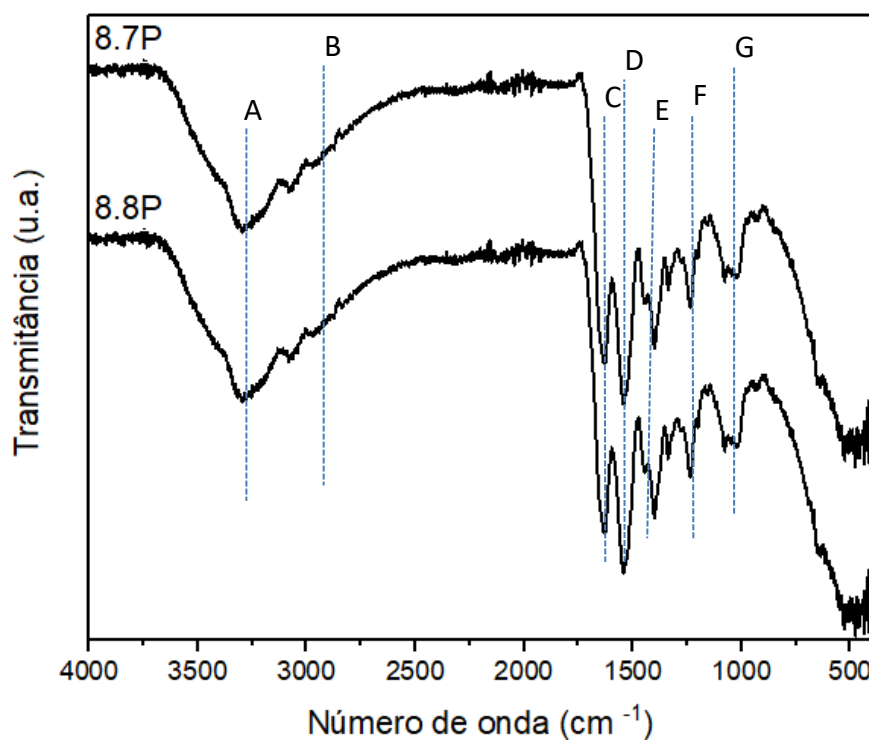


Figura 61: Espectros de absorção na região do infravermelho das amostras do grupo D (patas de rã)