

Extração, caracterização e hidrólise enzimática do colagénio da pele do peixe-espada-preto

Mariana Coutinho Silva

Dissertação para a obtenção do Grau de Mestre em

Engenharia Alimentar

Orientador(es): Doutora Carla Maria Feio Pires

Doutora Maria Luísa Louro Martins

Júri:

Presidente: Doutora Maria Luísa de Castro e Brito, Professora Auxiliar com Agregação do Instituto Superior de Agronomia da Universidade de Lisboa.

Vogais: Doutor Miguel Pedro de Freitas Barbosa Mourato, Professor Auxiliar do Instituto Superior de Agronomia da Universidade de Lisboa

Doutora Carla Maria Feio Pires, Investigadora Auxiliar do Instituto do Mar e da Atmosfera, I.P., orientadora.

Agradecimentos

A concretização desta nova etapa não teria sido possível sem toda a atenção, disponibilidade e carinho de várias pessoas que se cruzaram comigo ao longo do meu percurso académico e durante a realização da dissertação, principalmente às pessoas que tiveram comigo nestes últimos meses no IPMA. Quero agradecer com muito carinho:

À minha orientadora Engenheira Carla, por toda a sua disponibilidade em ajudar, pela simpatia, por toda a confiança que depositou no meu trabalho e por estar sempre por perto e nunca me deixar desamparada.

Ao Engenheiro Irineu Batista, por todo o seu conhecimento que transmitiu durante estes meses, por estar sempre pronto a ajudar e pela sua envolvimento neste trabalho.

À Professora Luísa, por toda a simpatia e disponibilidade em ajudar no que fosse preciso para a realização deste trabalho.

À Professora Anabela pela ajuda e contribuição neste trabalho e por estar sempre disponível para ajudar.

À minha irmã, ao meu pai e, principalmente, à minha mãe que tornaram tudo isto possível e nunca deixaram de acreditar em mim.

Ao meu namorado, Mário Cardoso, por toda a paciência nestes últimos anos, principalmente nestes recentes meses, por nunca desistir de mim nem deixar de acreditar nas minhas capacidades e, especialmente, nunca deixou de me amar.

Às minhas melhores amigas, Joana Silva e Sara Carvalho, por estarem sempre prontas a ajudar-me a encontrar forças nos momentos mais difíceis, não me deixarem cair e conseguirem sempre fazer-me sorrir.

Aos meus eternos amigos bioquímicos, Filipa Quinaz, André Gutierrez, Diana Vale, Daniela Bettencourt, Ricardo Laia, Beatriz Santos, João Ricardo e Hugo Monteiro, por continuarem sempre presentes na minha vida e transmitirem sempre a alegria que preciso para lutar.

Às minhas queridas amigas, Solange Fragoso, Cláudia Correia e Rute Rosa, por terem aparecido nestes últimos dois anos e por toda a força que me deram para conseguir cumprir este novo objetivo.

Resumo

A produção de filetes de peixe-espada-preto, *Aphanopus carbo*, (PEP) gera um volume considerável de peles as quais constituem uma fonte de colagénio. Assim, os objetivos do presente trabalho foram: (i) a extração e caracterização do colagénio das peles de PEP, (ii) preparação de hidrolisados do colagénio extraído e (iii) caracterização e avaliação da atividade antioxidante dos hidrolisados.

A composição química das peles de PEP foi 64,1% de humidade, 21,8% de gordura, 11,8% de proteína e 0,67% de cinza. O rendimento da extração do colagénio com ácido acético (ASC) variou entre 16,06 e 30,54% e com pepsina (PSC) entre 2,20 e 3,55%. O teor proteico do ASC e PSC situou-se entre 74,9 e 76,6% e 60,8 e 71,0%, respetivamente. As amostras eram ricas em glicina e alanina e possuíam um teor de iminoácidos entre 13,4 e 15,5% e um grau de hidroxilação da prolina entre 23,7 e 33,0%. Os perfis eletroforéticos do ASC e PSC evidenciaram a presença das cadeias α -1 e α -2 típicas do colagénio do tipo I. A solubilidade do ASC foi máxima entre pH 2 e 6 e, na presença de sal, diminuiu até a uma concentração de 17,5%. O espectro UV-visível apresentou um máximo característico de absorvância a 227 nm. O ASC exibiu uma brancura (ca. 80) superior à do PSC (ca. 53). A análise reológica mostrou que a solução de colagénio a pH 7 apresentou características de um gel muito frágil e a pH 2 comportou-se com uma dispersão. Ambas as soluções exibiram o comportamento de um fluido reofluidificante. A temperatura de desnaturação dinâmica a pH 2 foi de 32,5°C. Os hidrolisados de colagénio obtidos por aquecimento com micro-ondas apresentaram um grau de hidrólise de 7% após 10min. Estes tinham um teor de proteína de 26% e péptidos com massas moleculares entre 1 700 e 8 800 Da e uma atividade antioxidante relativamente baixa.

Palavras-Chave: pele de peixe-espada-preto; *Aphanopus carbo*; subprodutos; colagénio solúvel em ácido e pepsina; hidrolisados de colagénio.

Abstract

The production of black scabbardfish, *Aphanopus carbo*, (BSF) fillets produced a significant amount of skins that constitute a source of collagen. The objective of this study was: (i) the extraction and characterization of the collagen from BSF skin and (ii) preparation and characterization of collagen hydrolysates from the skin and evaluation of their antioxidant activity.

The proximate composition of BSF skin was 64.1% moisture, 21.8% fat, 11.8% protein and 0.67% ash. The yield of acid soluble collagen (ASC) was between 16.06 and 30.54% and that of pepsin soluble collagen (PSC) range between 2.20 and 3.55%. The protein content of ASC and PSC was between 74.9 and 76.6% and 60.8 and 71.0%, respectively. The samples were rich in glycine and alanine, their imino acids content ranged between 13.4 and 15.5% and the proline hydroxylation varied between 23.7 and 33.0%. The electrophoretic pattern of ASC and PSC showed the presence of the α -1 and α -2 chains, which are typical of type I collagen. The maximum solubility of ASC was observed between pH 2 and 6 and, in the presence of salt, the solubility decreased up to a concentration of 17.5%. The ultraviolet absorption spectrum of ASC showed the characteristic absorption at 227 nm. The whiteness of ASC (ca. 80) was higher than that of PSC (ca. 53). The rheological analysis showed the collagen solution at pH 7 exhibited the characteristics of weak fragile gel and at pH 2 behaved like a dispersion. The dynamic denaturation temperature at pH 2 was 32.5°C. The collagen hydrolysates obtained from micro-wave heating shows a degree of hydrolysis of 7% after 10min. The protein content was 26% and the molecular weight of the main peptides was between 1 700 and 8 000 Da. The antioxidant activity of collagen hydrolysate was relatively low.

Keywords: black scabbardfish skin; *Aphanopus carbo*; by-products; acid and pepsin soluble collagen; collagen hydrolysates.

Índice

Resumo.....	i
Abstract.....	ii
Índice	iii
Índice de Tabelas	v
Índice de Figuras	vi
Lista de abreviaturas	viii
1. Introdução.....	1
1.1. Indústria do Pescado: os subprodutos e a importância da sua valorização	1
1.2. O colagénio	2
1.2.1. Estrutura e composição do colagénio	3
1.2.2. Biossíntese do colagénio e patologias associados	7
1.2.3. Aplicações do colagénio	9
1.3. Extração do colagénio	10
1.4. Hidrolisados de colagénio.....	14
1.5. Caracterização reológica	16
1.6. Situação do peixe-espada-preto em Portugal.....	19
1.7. Objetivo	20
2. Materiais e métodos	21
2.1. Materiais.....	21
2.2. Métodos	21
2.2.1. Extração do colagénio a partir das peles de PEP	21
2.2.2. Composição química aproximada.....	25
2.2.2.1 Determinação da humidade.....	25
2.2.2.2 Determinação da cinza total	25
2.2.2.3 Determinação da gordura	26
2.2.2.4 Determinação da proteína total.....	27
2.2.3. Determinação dos aminoácidos	27
2.2.4. Eletroforese SDS-PAGE	28
2.2.5. Solubilidade	28

2.2.5.1	Efeito no pH na solubilidade	28
2.2.5.2	Efeito da concentração de sal (NaCl) na solubilidade	29
2.2.5.3	Determinação da proteína por método de Bradford.....	29
2.2.6.	Espectro Ultravioleta	29
2.2.7.	Determinação dos parâmetros da cor.....	30
2.2.8.	Avaliação do comportamento reológico	31
2.2.9.	Hidrolisados enzimáticos de colagénio.....	32
2.2.9.1	Grau de Hidrólise	33
2.2.9.2	Atividade Antioxidante (DPPH, ABTS e Poder Redutor)	34
2.2.10.	Análise estatística.....	35
3.	Apresentação e Discussão de Resultados.....	36
3.1.	Composição química aproximada da matéria-prima	36
3.2.	Rendimento da extração do colagénio da pele de PEP	36
3.3.	Teor proteico do colagénio	38
3.4.	Perfil de aminoácidos	39
3.5.	Perfil electroforético (SDS-PAGE) das amostras de colagénio.....	41
3.6.	Solubilidade.....	42
3.6.1.	Efeito do pH na solubilidade.....	42
3.6.2.	Efeito da concentração de sal (NaCl) na solubilidade	43
3.7.	Espectro UV-visível das amostras ASC	44
3.8.	Parâmetros da cor das amostras do colagénio.....	46
3.9.	Propriedades reológicas	47
3.10.	Hidrolisados enzimáticos de colagénio	52
3.10.1.	Proteína total do hidrolisado de colagénio.....	54
3.10.2.	Grau de hidrólise	54
3.10.3.	Atividade antioxidante	55
4.	Conclusões e Perspetivas Futuras	57
5.	Referências Bibliográficas	60

Índice de Tabelas

Tabela 1 - Diferentes grupos e tipos de colagénio, assim como a composição da cadeia e a sua distribuição no organismo	7
Tabela 2 - Rendimentos obtidos na extração de colagénio de diferentes espécies e vários métodos.	14
Tabela 3 – Quantidade e valor dos desembarques de peixe-espada-preto	19
Tabela 4 – Condições seguidas na hidrólise do colagénio.	32
Tabela 5 - Composição química para as peles de PEP e outras espécies.	36
Tabela 6 - Rendimento dos respetivos ensaios realizados.	37
Tabela 7 – Rendimentos obtidos para o produto ASC e PSC para as peles de diferentes espécies.....	38
Tabela 8 - Teor proteico das diferentes amostras de colagénio.	38
Tabela 9 – Composição de aminoácidos, total de iminoácidos e grau de hidroxilação da prolina (HDP) das amostras ASC, PSC e peles de PEP.	40
Tabela 10 – Parâmetros da cor das amostras de colagénio ASC e PSC (L^* , a^* e b^*).	46

Índice de Figuras

Figura 1 - Esquematização da estrutura do colagénio, onde podemos observar o centro da estrutura com a glicina	3
Figura 2 – Estrutura molecular característica do colagénio..	4
Figura 3 - Conformações resultantes das associações dos diferentes tipos de colagénio ou interações com outros domínios.	6
Figura 4 - Extração de colagénio com pepsina em ácido acético 0,5 M a 4 °C. (A) Degradação do tecido não- colagenoso; (B) Rotura dos telopéptidos de colagénio pela pepsina; (C) Colagénio solúvel em pepsina ou atelocolagénio.....	12
Figura 5 - Extração do colagénio pelo efeito conjunto do ácido e dos ultrassons. (a) Fibra de colagénio; (b) Colagénio extraído pelo tratamento conjunto; (c) Produto de degradação do colagénio induzido pelo tratamento contínuo com o ácido e os ultrassons.....	13
Figura 6 - Curva de tensão em função da velocidade de deformação, representados os diferentes tipos de comportamento reológico.	17
Figura 7 - Curva de viscosidade típica de uma emulsão com comportamento reofluidificante e respetivas mudanças moleculares que ocorrem quando aplicado uma dada velocidade de deformação.	17
Figura 8 - Esquematização do processo de extração de colagénio solúvel em ácido (ASC).	23
Figura 9 - Esquematização do processo de extração de colagénio solúvel em pepsina (PSC).	24
Figura 10 – Representação espacial da cor segundo os parâmetros L*, a* e b*.	30
Figura 11 - Esquematização do processo de obtenção de hidrolisados de colagénio a partir de colagénio ASC das peles PEP.	33
Figura 12 – Perfil electroforético das amostras de colagénio ASC e PSC. 1 - Padrão, 2 - PSC 1.1; 3 - PSC 1.2; 4 – PSC 2.1; 5 – PC 2.2; 6 – ASC 1.1; 7 – ASC 1.2; 8- ASC 2.1; 9- ASC 2.2.....	41
Figura 13 - Solubilidade do colagénio ASC das peles de PEP em ácido acético 0,5 M a diferentes pH.	43
Figura 14 – Solubilidade do colagénio ASC em ácido acético 0,5 M a diferentes concentrações de NaCl (%).	44
Figura 15 – Espectro UV-visível de uma solução da amostra ASC 1.1 resultante da extração das peles de PEP.	45
Figura 16 – Espectro UV-visível de uma solução da amostra ASC 1.2 resultante da extração das peles de PEP, antes e depois da centrifugação.	46
Figura 17 – Produto final obtido da extração, após ser liofilizado. 1 – ASC, 2 – PSC.	47

Figura 18 – Evolução da tangente δ das soluções de colagénio em função da temperatura de 5 a 90 °C.....	48
Figura 19 – Cinéticas de maturação a 5 °C, durante 1 h, das amostras de colagénio a pH 2 e 7.....	49
Figura 20 – Espectro mecânico a 5 °C das amostras de colagénio a pH 2 e 7.	49
Figura 21 – Viscosidade em função da taxa de deformação das soluções de colagénio a pH 2 e 7.	50
Figura 22 - Viscosidade das soluções de colagénio a pH 2 e 7 em função da taxa de deformação, com o ajuste do modelo Ostwald-de Waele.....	51
Figura 23 - Viscosidade das soluções de colagénio a pH 2 e 7 em função da temperatura das peles de PEP.	52
Figura 24 - Perfil dos péptidos obtidos para os hidrolisados de colagénio com 1 % (A) e 3 % (B) de pepsina.	52
Figura 25 - Perfil dos péptidos obtidos para os hidrolisados de colagénio com 1 % (A) e 3 % (B) de protamex.....	53
Figura 26 - Perfil dos péptidos obtidos para os hidrolisados de colagénio com 1 % (A) e 3 % (B) de tripsina.	53
Figura 27 – Perfil de péptidos obtido pela hidrólise do colagénio com tripsina 3 %. 1 – ribonuclease A (13 700 Da), 2 – aprotinina (6 500 Da), 3 – angiotensina I (1 296 Da), 4 – triglicina (189 Da), 5 – glicina (75 Da).....	54
Figura 28 - Inibição dos radicais de ABTS do hidrolisado do colagénio.....	55
Figura 29 - Poder redutor do hidrolisado de colagénio das peles de PEP.	56

Lista de abreviaturas

Abs – absorvância

ABTS – 2,2'-azino-bis (ácido 3-etilbenzotiazolina-6-sulfónico)

ASC – colagénio solúvel em ácido (do inglês *Acid Soluble Collagen*)

DPPH – α,α -difeníl- β -picrilhidrazilo

DTT – ditioneitol

FAO – Organização das Nações Unidas para a Alimentação e a Agricultura (do inglês *Food and Agriculture Organization of the United Nation*)

G* – módulo complexo dinâmico

G' – módulo de conservação

G'' – módulo de dissipação

GH – grau de hidrólise

NP – norma portuguesa

OPA – o-ftaldeído

PAGE – eletroforese em gel de poliacrilamida (do inglês *PolyAcrylamide Gel Electrophoresis*)

PEP – peixe-espada-preto

PSC – colagénio solúvel com pepsina (do inglês *Pepsin Soluble Collagen*)

SDS - dodecil sulfato de sódio (do inglês *Sodium Dodecyl Sulphate*)

T_{dd} – temperatura de desnaturação dinâmica

Tris – tris(hidroximetil)aminometano

1. Introdução

1.1. Indústria do Pescado: os subprodutos e a importância da sua valorização

De acordo com a Organização das Nações Unidas para Alimentação e Agricultura (FAO) a produção de pescado mundial tem vindo a crescer gradualmente nos últimos cinco anos, bem como o seu consumo. Em 2012, a indústria de pescado foi responsável pela captura de 158 milhões de toneladas de peixe em regime de captura e de aquacultura, das quais cerca de 136,2 milhões de toneladas destinaram-se ao consumo humano e cerca de 21,7 milhões de toneladas foram destinadas para uso não alimentar. Para este ano, o consumo humano traduziu-se em 18 kg de peixe *per capita* (FAO, 2014).

O pescado apresenta um elevado valor nutricional, devido principalmente ao teor de proteína. Uma porção de 150 g de peixe pode fornecer cerca de 50 a 60 % da proteína diária necessária para um adulto. O pescado possui também uma fração lipídica rica em ácidos gordos insaturados da série n-3 tais como o EPA (ácido eicosapentaenóico) e o DHA (ácido docosahexaenóico). Os vários efeitos benéficos para a saúde destes ácidos gordos têm sido demonstrados em múltiplos trabalhos científicos (Simopoulos, 1999). O reconhecido valor biológico dos lípidos do pescado tem levado à sua utilização em várias indústrias como a alimentar, farmacêutica e cosmética. As proteínas e os lípidos, bem como outros constituintes do pescado, estão presentes nos respetivos subprodutos levando a um interesse crescente pela valorização deste material.

No processamento de pescado geram-se quantidades significativas de subprodutos que podem representar 50 a 80 % do peso inicial da matéria-prima. Estes subprodutos são tradicionalmente convertidos em farinha e óleo de peixe. Em 2012, cerca de 35 % da produção de farinha de peixe foi obtida a partir de resíduos resultantes da indústria de pescado (FAO, 2014). A farinha e óleo de peixe apresentam uma elevada procura, particularmente para a produção de rações para aquacultura. Contudo, estes produtos não apresentam grande valor acrescentado, fazendo com que as empresas procurem alternativas para os subprodutos gerados tornando-os uma mais-valia económica (Kim e Mendis, 2006; Wang *et al.*, 2008; Muralidhara *et al.*, 2013).

Os subprodutos de pescado são constituídos por cabeças, vísceras, barbatanas, espinhas, pedaços de peixe, peixe deteriorado, carapaças de crustáceos, conchas de bivalves, entre outros. Estes constituintes podem encontrar-se misturados, mas

determinadas operações tecnológicas permitem obtê-los separadamente, facilitando a sua posterior utilização. Destes componentes cerca de 30 % corresponde a espinhas, escamas e peles, material que surge como fonte de colagénio, cuja extração permitirá uma maior valorização destes subprodutos (Wang *et al.*, 2008; Muralidhara *et al.*, 2013).

1.2. O colagénio

O colagénio é uma proteína estrutural que se encontra nos vertebrados, correspondendo a cerca de 25 a 30 % da proteína total, estando localizado na matriz extracelular, sendo a principal componente do tecido conjuntivo (Ogawa *et al.*, 2004; Engel e Bächinger, 2005; Aberoumand, 2012). Encontra-se amplamente distribuído por vários tecidos dos organismos, que incluem os ossos, pele, tendões, ligamentos, sistema vascular e tecido conjuntivo intramuscular, contribuindo desta forma para a estabilidade e integridade dos tecidos e órgãos dos vertebrados (Liu *et al.*, 2012). No caso da pele, esta proteína é normalmente conhecida por estar associada à firmeza, estrutura e elasticidade e é produzida de forma natural pelo organismo, mas também poderá ser proveniente da ingestão de alimentos ricos em colagénio, como o caso de gelatinas ou suplementos alimentares ricos neste constituinte.

Devido à sua excelente biocompatibilidade e biodegradabilidade, o colagénio é um dos biomateriais mais procurados pela indústria farmacêutica, cosmética, biomédica e alimentar (Wang *et al.*, 2008; Zhang *et al.*, 2009; Ahmad *et al.*, 2010). Grande parte do colagénio comercial provém da pele de bovino, porco ou desperdícios resultantes do processamento do frango (Aberoumand, 2012; Muralidhara *et al.*, 2013). Porém, a utilização de colagénio de origem animal terrestre não é bem aceite em certas religiões, como o Islão, Judaísmo ou Hinduísmo, e também algumas etnias devido às suas crenças. Por outro lado, a presença de contaminantes biológicos responsáveis por desenvolver doenças como a encefalopatia espongiforme bovina (vulgarmente conhecida como a doença das vacas loucas), encefalopatia espongiforme transmissível e doença do mão-pé-boca, faz com que haja necessidade de procurar outras formas de produzir colagénio sem perigo para o Homem e que seja aceite por todas as comunidades religiosas e grupos étnicos. A extração de colagénio a partir de animais marinhos surge como uma alternativa a outras origens, visto que não existe qualquer impedimento por parte das comunidades ao consumo de colagénio de origem marinha (Aberoumand, 2012).

Contudo, as propriedades químicas e físicas do colagénio obtido a partir de animais marinhos e de animais terrestres são diferentes (Pati *et al.*, 2010), o que pode condicionar a sua utilização industrial.

1.2.1. Estrutura e composição do colagénio

A massa molecular do colagénio é cerca de 330 kDa e depende da sua origem, ou seja, da espécie. É uma proteína que apresenta a capacidade de formar fibras insolúveis com elevada resistência à tensão e estabilidade. O colagénio apresenta uma estrutura tridimensional constituída por uma tripla hélice com cerca de 1 000 aminoácidos cada (Regenstein e Zhou, 2007). Apesar das cadeias de colagénio apresentarem diferenças entre si, todos os tipos de colagénio apresentam uma característica comum: a cadeia direita da tripla hélice é composta por cadeias α (Dybka e Walczak, 2009).

A estrutura do colagénio é estabilizada pela repetição da sequência de três aminoácidos, em que a primeira posição da sequência é sempre ocupada pela glicina e as outras normalmente pela prolina e hidroxiprolina, observando-se uma repetição ao longo da cadeia a sequência Gly-X-Y. Desta forma, a glicina representa cerca de 33 % dos aminoácidos totais, a prolina corresponde entre 12 a 14 % e hidroxiprolina a mais de 14 % (Ogawa *et al.*, 2004; Gómez-Guillén *et al.*, 2005; Aberoumand, 2012; Liu *et al.*, 2012).

A glicina está localizada no centro da tripla hélice, sem qualquer tipo de interação com outros aminoácidos, formando assim uma estrutura sem repulsões e estável (Fig. 1) (Regenstein e Zhou, 2007).

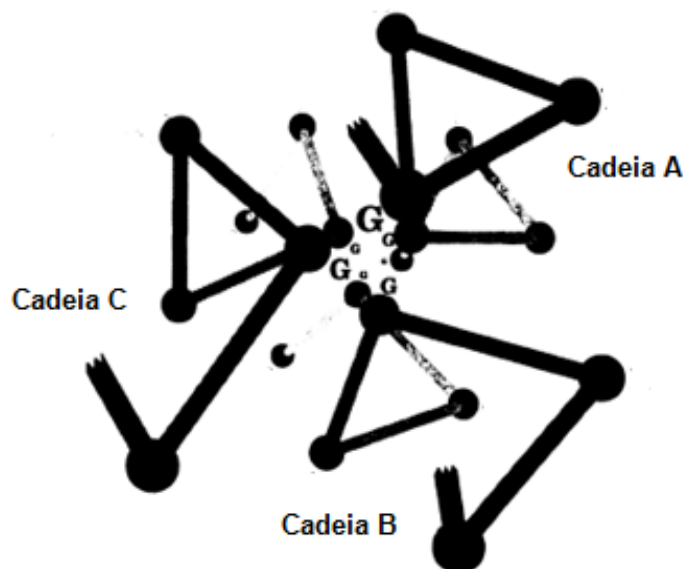


Figura 1 - Esquemática da estrutura do colagénio, onde podemos observar o centro da estrutura com a glicina. **Fonte:** Rest e Garrone, 1991.

A particular estabilidade da tripla hélice do colagénio deve-se aos anéis da pirrolidina presentes nos aminoácidos hidroxiprolina e prolina que permitem diminuir os impedimentos estereoquímicos, e também aos grupos hidroxilo (-OH) que permitem estabelecer ligações por pontes de hidrogénio entre as diferentes cadeias polipeptídicas (Gómez-Guillén *et al.*, 2005; Regenstein e Zhou, 2007).

Nas extremidades da cadeia do colagénio é possível observar uma zona com polipéptidos não helicoidais e que se designam por telopéptidos. A extremidade C-propéptido apresenta um papel muito importante na iniciação da formação da tripla hélice, enquanto a extremidade N-propéptido, encontra-se diretamente envolvida na regulação das fibrilas. Na figura 2 encontra-se representada a tripla hélice típica do colagénio (Gelse *et al.*, 2003).

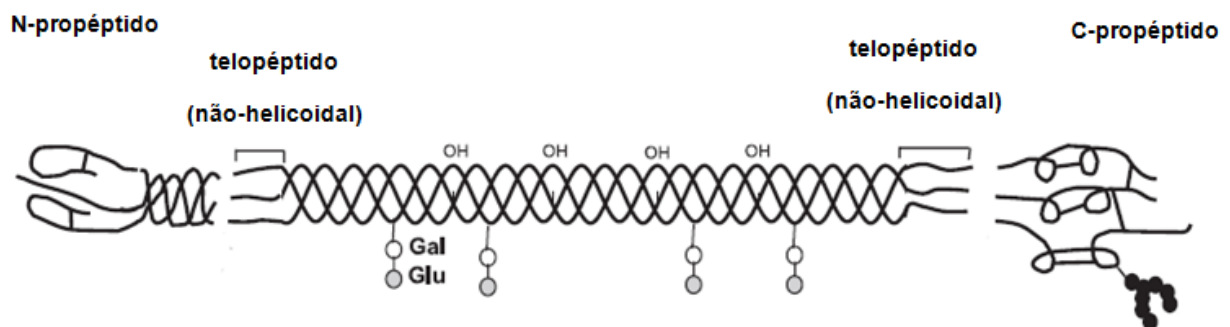


Figura 2 – Estrutura molecular característica do colagénio. **Fonte:** Gelse *et al.*, 2003.

Nos organismos vertebrados, as três cadeias helicoidais do colagénio constituem o tropocolagénio e as suas uniões em complexos e de forma aleatória permitem que se formem fibras e redes nas membranas dos tecidos, ossos e membrana basal (Jain *et al.*, 2014).

Os múltiplos estudos sobre o colagénio levaram à identificação de 29 tipos que diferem na sequência de aminoácidos, função e estrutura, sendo identificadas 42 cadeias de polipéptidos diferentes. As proteínas de colagénio podem ser agrupadas consoante as suas semelhanças de estrutura e organização molecular, constituindo várias famílias de colagénio: colagénio responsável pela formação de fibrilas, colagénios associados a fibrilas com interrupções na tripla hélice (FACIT, *Fibri-Associated Collagens with Interrupted Triple Helices*), colagénio de rede, fibrilas de ancoragem, multiplexina e colagénios associados em membrana com interrupções na tripla hélice (MACIT, *Membrane-Associated Collagens with Interrupted Triple Helices*) (Dybka e Walczak, 2005; Shoulders e Raines, 2009; Jain *et al.*, 2014; Wang *et al.*, 2014).

Os diferentes tipos de colagénio são classificados de I a XXIX, sendo o do tipo I o componente principal da matriz extracelular que confere força e resistência aos tecidos biológicos (Giraud-Guille *et al.*, 2000; Wang *et al.*, 2014). O colagénio do tipo I representa cerca de 90 % da massa orgânica dos ossos, estando também presente nos tendões, pele, ligamentos, córnea e em vários tecidos conjuntivos intersticiais (Gelse *et al.*, 2003; Liu *et al.*, 2012). Dos restantes tipos de colagénio, os mais frequentes são o II, III, IV e V. Os colagénios do tipo II e III são os principais componentes das cartilagens e fibras reticulares, respetivamente. Quanto ao colagénio do tipo IV participa na formação das células da membrana basal. Por sua vez, o colagénio do tipo V encontra-se na superfície das células e do cabelo, admitindo-se que esteja presente também na placenta (Zahrani, 2010).

Conforme referido, todos os tipos de colagénio são constituídos por três cadeias α , que podem ser todas iguais, designando-se por homotrímeros, como é o caso do colagénio do tipo II, III, VII, VIII, X, XIII, XV, XVII, XXIII, XXV. Por outro lado, outros tipos de colagénio como o I, IV, V, VI, IX e XI são heterotrímeros, uma vez que, são constituídos por duas ou três cadeias α diferentes (Dybka e Walczak, 2009).

O colagénio associado a fibrilas com interrupções na tripla hélice (FACIT), encontra-se ligado ao colagénio fibrilar. Por exemplo, o colagénio do tipo IX encontra-se covalentemente ligado à superfície do colagénio fibrilar composto por colagénio do tipo II. A estrutura do FACIT é caracterizada por domínios de colagénio interrompidos pelas pequenas cadeias não-helicoidais e pelas moléculas associadas às superfícies das várias fibrilas (Gelse *et al.*, 2003; Jain *et al.*, 2014).

Quanto às restantes famílias de colagénio (de rede, de ancoragem, multiplexina e MACIT), pouco se sabe sobre o seu papel, apenas é conhecida a sua conformação mais estável, com a possibilidade de interações com outras moléculas e onde se encontra.

Na figura 3 apresentam-se algumas conformações dos diferentes tipos de colagénio.

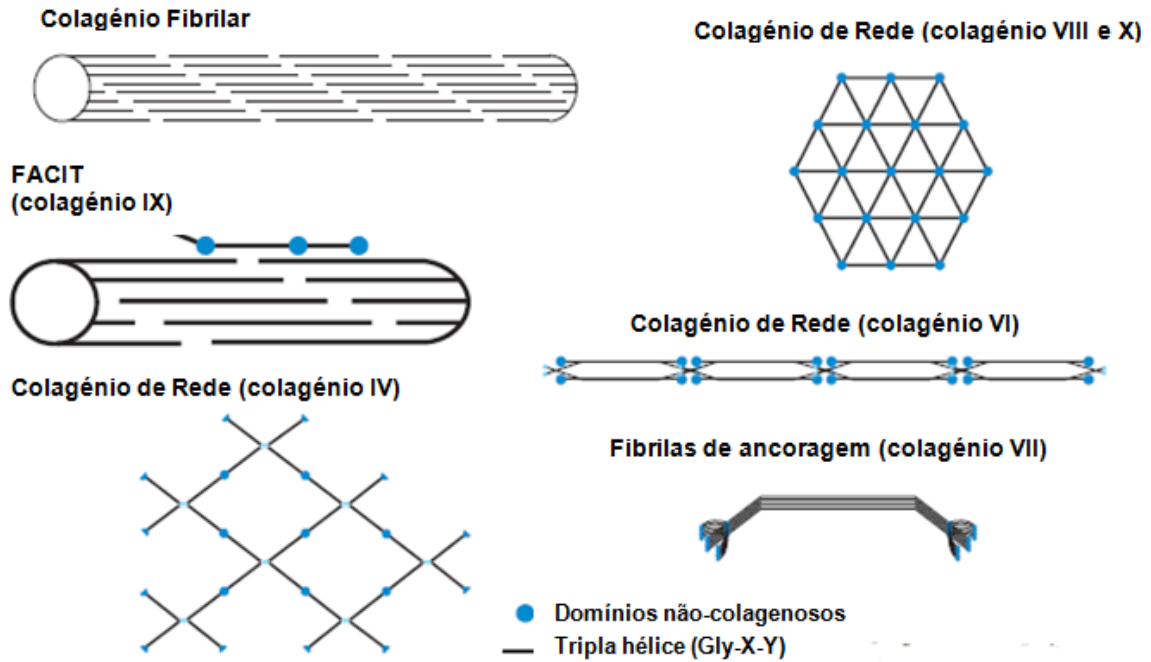


Figura 3 - Conformações resultantes das associações dos diferentes tipos de colagénio ou interações com outros domínios. **Fonte:** Ricard-Blum, 2011.

Na tabela 1 encontram-se discriminados os diferentes tipos de colagénio pertencentes a um grupo específico, bem como a sua estrutura e distribuição no organismo.

I

Tabela 1 - Diferentes grupos e tipos de colagénio, assim como a composição da cadeia e a sua distribuição no organismo. **Fonte:** Gelse *et al.*, 2003; Jain *et al.*, 2014.

Grupo	Tipo	Composição	Distribuição
Colagénio responsável pela formação de fibrilas	I	$\alpha 1[I]_2\alpha 2[I]$	Derme, ossos, tendões, ligamentos
	II	$\alpha 1[II]_3$	Cartilagem, vítreo
	III	$\alpha 1[III]_3$	Pele, vasos sanguíneos, intestino
	V	$\alpha 1[V]_3$ $\alpha 1[V]_2\alpha 2[V]$	Córnea, placenta (derme e ossos encontram-se em pequenas quantidades)
	XI	$\alpha 1[XI]\alpha 2[XI]\alpha 3[XI]$	Cartilagem, disco intervertebral
	XXIV	-	Coração, retina
	XVII	-	Cartilagem
FACIT	IX	$\alpha 1[IX]\alpha 2[IX]\alpha 3[IX]$	Cartilagem, córnea, vítreo
	XII	$\alpha 1[XII]_3$	Derme, tendões
	XIV	$\alpha 1[XIV]_3$	Disperso pelos ossos, derme e cartilagem
	XVI	$[a1(XVI)]_3$	Derme, rins
	XIX	$[a1(XIX)]_3$	Membrana basal
	XX	$[a1(XX)]_3$	Córnea
	XXI	$[a1(XXI)]_3$	Estômago, rins
	XXII	-	Tecido conjuntivo
	XXVI	-	Testículos, ovários
Fibrilas de ancoragem	VII	$\alpha 1[VII]_2\alpha 2[VII]$	Derme, bexiga
Colagénio de rede	IV	$\alpha 1[IV]_2\alpha 2[IV]$	Membrana basal
	VI	$\alpha 1[VI]\alpha 2[VI]$ $\alpha 3[VI]$	Disperso pelos ossos, derme e cartilagem
	VIII	$\alpha 1[VIII]_3$ $\alpha 2[VIII]_3$	Disperso pela derme, cérebro, coração e rins
	X	$\alpha 1[X]_3$	Cartilagem
Multiplexina	XV	$[a1(XV)]_3$	Capilares, testículos, rins, coração
	XVIII	$[a1(XVIII)]_3$	Fígado, membrana basal
MACIT	XIII	$[a1(XIII)]_3$	Células endoteliais, olhos, derme, coração
	XVII	$\alpha 1[XVII]_3$	Junção da derme com a epiderme
	XXV	-	Cérebro, coração, testículos

1.2.2. Biossíntese do colagénio e patologias associados

A biossíntese do colagénio inicia-se com o processo de transcrição do gene com vários procedimentos complexos desde a agregação dos heterotrímeros até à formação de longas fibrilas, associadas em tripla hélice, com diferentes funções nos respetivos locais dos

organismos, envolvendo processos no interior e no exterior das células. Este processo tem sido particularmente estudado no caso do colagénio do tipo I o qual, sendo o mecanismo base para a formação da tripla hélice, pode ser aplicado aos outros tipos de colagénio (Gelse *et al.*, 2003).

O colagénio é sintetizado pelos fibroblastos, células com origem na mesoderme. Estas células são as mais numerosas do tecido conjuntivo e tem como função garantir a viabilidade e amplificar a atividade mitótica e a síntese das fibrilas, especialmente na cicatrização das feridas. As células no seu estado maduro são conhecidas como fibrócitos e encontram-se com mais frequência nos tendões e ligamentos (Jain *et al.*, 2014).

Os primeiros processos ocorrem dentro da célula, onde ocorre primeiro o processo de transcrição de ADN e de seguida o processo de tradução. Através deste processo é possível traduzir a informação presente nos genes com a finalidade de produzir diferentes aminoácidos, levando à formação de duas cadeias α (α -1 e α -2). Este processo ocorre nos ribossomas presentes no retículo endoplasmático rugoso (RER), formando-se inicialmente uma cadeia de péptidos denominada preprocolagénio (Gelse *et al.*, 2003; Jain *et al.*, 2014). Este é libertado no lúmen do RER, ocorrendo depois várias modificações pós-tradução, tais como hidroxilação da prolina e da lisina, as quais dependem do ácido ascórbico (vitamina C) como cofator. A formação da hidroxiprolina é de extrema importância porque vai permitir a formação de ligações intramoleculares por pontes de hidrogénio, contribuindo para a estabilidade da estrutura em tripla hélice. A hidroxilisina, por sua vez, é responsável pelas ligações entre as cadeias das fibrilas, isto é, contribui para a estabilização e formação das ligações cruzadas do colagénio (Dybka e Walczak, 2009; Li *et al.*, 2013; Jain *et al.*, 2014).

Posteriormente ocorre a glicosilação específica dos resíduos de hidroxilisina, formando-se assim a molécula em tripla hélice, chamada procolagénio, transportada por vesículas do aparelho de Golgi e libertado para o exterior da célula por exocitose (Dybka e Walczak, 2009; Jain *et al.*, 2014). No exterior da célula, ocorre a rotura das extremidades (zonas não-helicoidais), formando tropocolagénio, seguindo-se a polimerização em que a junção de várias moléculas permite formar as fibrilas de colagénio. Esta forma de colagénio, através de ligações cruzadas, permite agrupar as fibrilas de colagénio, levando à formação de fibras de colagénio (Jain *et al.*, 2014).

O estudo da biossíntese do colagénio e da sua estrutura molecular bem como a associação dos diferentes tipos de colagénio tem sido muito importante para conseguir entender certas patologias associadas ao colagénio. Por exemplo, o escorbuto é uma das mais conhecidas patologias associada ao colagénio.

O escorbuto é uma doença cuja etiologia está relacionada com a deficiente biossíntese do colagénio. Esta doença é desencadeada pela ausência ou falta de vitamina C no organismo. Já anteriormente referido, a vitamina C atua como cofator na síntese de colagénio sendo necessário para a hidroxilação da prolina e lisina. A carência ou ausência da vitamina C resulta na formação irregular do colagénio, condicionando a formação de osteoblastos e, por sua vez, diminuindo ou anulando a formação de osteóide. Os osteoblastos, assim como os fibroblastos, têm a capacidade de sintetizar tecido ósseo e são responsáveis por sintetizar osteóides que representam a parte não mineralizada da matriz óssea que se forma antes da maturação do tecido ósseo. Assim, os baixos níveis de vitamina C afetam o metabolismo do colagénio que, por consequência, afeta a capacidade de regeneração e reparação dos tecidos (Jain *et al.*, 2014).

Outra doença relacionada com o colagénio é a osteogénese imperfeita. Trata-se de uma doença rara, hereditária e conhecida por interferir na formação óssea, tendo como consequência uma elevada fragilidade óssea causada pela baixa massa óssea. A causa desta doença está relacionada com mutações que ocorrem nos genes durante a síntese proteica do colagénio do tipo I, podendo ocorrer vários tipos de mutações. A osteogénese imperfeita pode ser classificada consoante a sua gravidade, existindo até à data quatro tipos de patologias do tipo I ao tipo IV, em que o do tipo IV apresenta um quadro clínico mais diversificado. Todos estes tipos de patologias encontram-se associados a mutações nos genes do colagénio do tipo I, ocorrendo a mais comum no codão da glicina que leva à sua substituição por outros aminoácidos, diminuindo assim a estabilidade da tripla hélice (Engel e Bächinger, 2005; Roughkey *et al.*, 2003).

1.2.3. Aplicações do colagénio

O colagénio apresenta várias vantagens como biomaterial, tais como a abundância e facilidade em ser extraído a partir dos organismos, a bioacessibilidade, a sua sinergia com componentes bioativos, não ser tóxico, ser biocompatível e compatível com polímeros sintéticos.

Devido às suas propriedades, na área da engenharia de tecidos, o colagénio afirma-se como sendo o biomaterial mais utilizado pela sua excelente biocompatibilidade, biodegradabilidade e fraca antigenicidade, sendo procurado também pela área da cosmética pelas mesmas razões e utilizado para o fabrico de champôs, cremes faciais, loções corporais entre outros produtos cosméticos (Zahrani, 2010; Pal e Suresh, 2016).

O colagénio tem sido também utilizado nas áreas da medicina e farmácia como molécula transportadora de drogas, proteínas e genes, sendo um exemplo dessa aplicação

a utilização de fármacos para tratamento de cancro (Kim e Mendis, 2006). Também tem sido usado para intervenções cirúrgicas cardiovasculares e plásticas e em outras áreas da medicina como ortopedia, urologia, neurologia e oftalmologia, sendo ainda também utilizado para a reconstrução de pele artificial através da interação de colagénio com outras moléculas (Zahrani, 2010).

Até à data, não existe na legislação alimentar qualquer restrição sobre os limites ou os inconvenientes em utilizar colagénio nos alimentos. A atividade oxidante do colagénio permite conferir estabilidade oxidativa a certos produtos alimentares, prevenindo processos de oxidação. Pal e Suresh (2016) referem a utilização do colagénio como impeditivo de processos oxidativos que leva ao aumento do período de conversação útil da carne através do revestimento da superfície com colagénio.

Contudo, existem algumas dificuldades e inconvenientes na utilização do colagénio a nível industrial, como sejam: o elevado custo em purificar colagénio tipo I (o mais comum e abundante), variabilidade em isolar colagénio, efeitos colaterais e apresentar baixa estabilidade térmica (Lee *et al.*, 2001; Pati *et al.*, 2010).

1.3. Extração do colagénio

A extração de colagénio a partir de produtos de origem marinha processa-se, fundamentalmente, em três fases: (i) pré-tratamento da matéria-prima, (ii) extração do colagénio propriamente dita e (iii) purificação do colagénio. Na primeira fase inclui-se a limpeza e fragmentação do material para facilitar as subseqüentes operações de extração as quais têm como objetivo eliminar as frações proteicas não colagenosas, lípidos, pigmentos e outros constituintes. No caso das espinhas e escamas de peixe torna-se também necessária uma desmineralização para eliminar o carbonato de cálcio e outros constituintes inorgânicos (Regenstein e Zhou, 2007). A fração de proteínas não-colagenosas é removida usualmente por extração com uma solução de NaOH 0,1 M (Sionkowska *et al.*, 2015; Chuaychan *et al.*, 2015; Pal *et al.*, 2015). Liu *et al.* (2015) verificaram que a extração do colagénio da pele de carpa (*Ctenopharyngodon idella*) com soluções de NaOH com a concentração de 0,05 M ou 0,1 M permitia a obtenção de colagénio sem perdas significativas, mas a extração com soluções de NaOH mais concentradas (0,2 M ou 0,5 M) reduzia a percentagem de colagénio extraído e provocava alterações estruturais nesta proteína. A extração de colagénio com NaOH leva também à rotura de ligações cruzadas do colagénio, facilitando assim a sua extração (Schrieber e Gareis, 2007). No processo de extração de colagénio da pele de esturção (*Acipenser schrenckii*), Wang *et al.* (2014b)

procederam à eliminação das proteínas não-colagenosas recorrendo a uma solução de NaCl a 20 %.

Na desmineralização da matéria-prima para eliminar o cálcio ou outros constituintes inorgânicos tem sido utilizado EDTA 0,5 M (Liang *et al.*, 2014). No que respeita a eliminação da fração lipídica, é usual a utilização de álcool butílico a 10 % (Li *et al.*, 2013; Kaewdang *et al.*, 2014), mas Nagai *et al.* (2015) recorreram a etanol a 10 % como alternativa para remover a gordura.

Na segunda fase de extração do colagénio têm surgido propostas de utilização de diferentes metodologias que se podem agrupar nas seguintes:

- a. Solubilização do colagénio numa solução salina;
- b. Solubilização do colagénio numa solução ácida;
- c. Solubilização do colagénio com enzimas proteolíticas;
- d. Extração do colagénio com recurso a ultrassons.

O processo de extração com uma solução de NaCl 0,45 M durante 24 horas foi utilizado por Liang *et al.* (2014) e Wang *et al.* (2014b), respetivamente, em cartilagens e peles de esturjão. No entanto, o processo de extração com uma solução ácida é o mais utilizado, tendo sido usados vários ácidos orgânicos como o ácido acético (Muyonga *et al.*, 2004; Liang *et al.*, 2014; Pal *et al.*, 2015), tricloroacético (Fitch *et al.*, 1955), cítrico (Sadowska *et al.*, 2003) e láctico (Skierka e Sadowska, 2007). O recurso a ácidos inorgânicos como o ácido clorídrico tem sido proposto para a extração de colagénio presente em restos arqueológicos (Caputo *et al.*, 2012; Sealy *et al.*, 2014). O colagénio extraído com ácido é designado por colagénio solúvel em ácido (ASC, *Acid Soluble Collagen*).

Diferentes enzimas proteolíticas como a pepsina, tripsina e colagenase têm sido usadas para aumentar o rendimento da extração de colagénio por solubilização ácida. A pepsina é a mais utilizada na extração de colagénio de origem marinha, podendo atuar conjuntamente com uma solução de ácido acético ou isoladamente após extração prévia do colagénio com ácido acético. O colagénio extraído com a pepsina é designado por colagénio solúvel com pepsina (PSC, *Pepsin Soluble Collagen*). A aplicação de níveis limitados desta enzima permite aumentar o rendimento do processo de extração, tal como verificado por vários autores (Liang *et al.*, 2014; Wang *et al.*, 2014b; Pal *et al.*, 2015; Mahboob, 2015; Chuaychan *et al.*, 2015). A extração de colagénio com uma quantidade limitada de pepsina é um método que apresenta algumas vantagens: a pepsina pode hidrolisar proteínas não-colagenosas e estas proteínas hidrolisadas podem ser removidas, usando a precipitação com sal e a diálise para aumentar a pureza do colagénio; a hidrólise dos telopéptidos do

colagénio torna-o mais facilmente solúvel em condições ácidas, resultando um aumento da eficiência da extração; a digestão com pepsina pode reduzir a antigenicidade provocada pelos telopéptidos do colagénio, permitindo assim ultrapassar problemas relevantes em aplicações nas indústrias alimentar e farmacêutica (Matmaroh *et al.*, 2011; Benjakul *et al.*, 2012; Wang *et al.*, 2014a). Na figura 4 apresenta-se esquematicamente a extração de colagénio com pepsina.

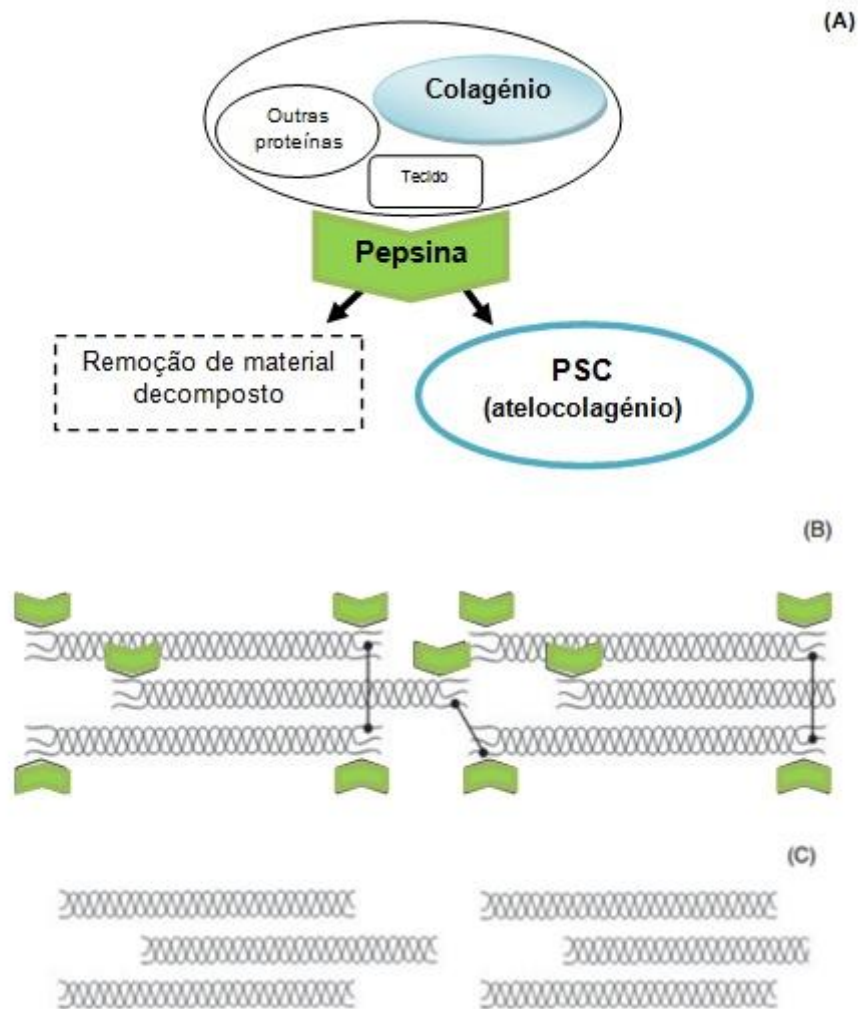


Figura 4 - Extração de colagénio com pepsina em ácido acético 0,5 M a 4 °C. (A) Degradação do tecido não-colagenoso; (B) Rotura dos telopéptidos de colagénio pela pepsina; (C) Colagénio solúvel em pepsina ou atelocolagénio. **Fonte:** adaptado de Benjakul *et al.*, 2012.

Outra alternativa de extração do colagénio envolve a aplicação de ultrassons (20 kHz com amplitudes entre 20 a 85 %) a subprodutos de origem marinha (Kim *et al.*, 2013; Yang *et al.*, 2013; Ran e Wang, 2014) o que permite melhorar o rendimento da extração. Neste processo, os subprodutos, após pré-tratamento, são imersos numa solução de ácido acético durante 12 horas, procedendo-se então à extração com a aplicação de ultrassons. O rendimento obtido depende da amplitude e duração do tratamento, o qual é superior ao

atingido pelo método tradicional (Kim *et al.*, 2013). Verificou-se também que este tratamento não provocava alterações nos principais componentes do colagénio. A aplicação de ultrassons na extração de colagénio está representada na figura 5.

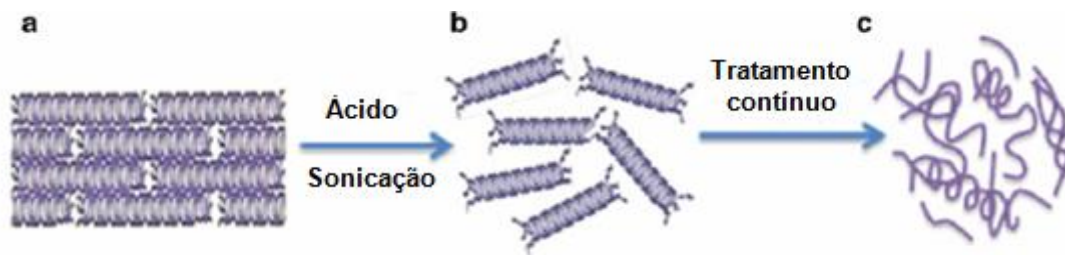


Figura 5 - Extração do colagénio pelo efeito conjunto do ácido e dos ultrassons. (a) Fibra de colagénio; (b) Colagénio extraído pelo tratamento conjunto; (c) Produto de degradação do colagénio induzido pelo tratamento contínuo com o ácido e os ultrassons. **Fonte:** adaptado de Kim *et al.*, 2013.

A terceira fase de extração do colagénio inclui os processos de recuperação do colagénio solubilizado a qual é realizada, normalmente, por precipitação com NaCl, seguindo-se a centrifugação, diálise e liofilização. Na precipitação do colagénio adiciona-se NaCl até uma concentração final de 2,6 M na presença de Tris a pH 7,5 (Benjakul *et al.*, 2010). No entanto, a concentração de NaCl pode ser ajustada a cada caso de modo a permitir maximizar a recuperação de colagénio e a remoção das impurezas. O colagénio precipitado é recuperado por centrifugação e re-solubilizado num volume mínimo de ácido acético 0,5 M, seguindo-se a diálise contra ácido acético 0,1 M e água destilada. O dialisado é finalmente seco por liofilização.

O rendimento atingido na extração do colagénio e as respetivas propriedades dependem não só da matéria-prima usada e do estado de conservação, mas também do método seguido na extração. Todos os métodos têm em comum a execução dos diferentes passos a baixa temperatura de modo a evitar a degradação do colagénio (Regenstein e Zhou, 2007). Na tabela 2 apresentam-se alguns rendimentos obtidos na extração do colagénio a partir de barbatanas, cartilagens, escamas, espinhas e peles de várias espécies de peixes por diferentes métodos de extração.

Tabela 2 - Rendimentos obtidos na extração de colagénio de diferentes espécies e vários métodos.

Matéria-prima	Método	Rendimento (%)	Referência
Barbatanas de catla <i>(Catla catla)</i>	ASC	6,7	Mahboob, 2015
	PSC	8,8	
Cartilagens de esturção <i>(Acipenser schrenckii)</i>	SSC	2,18	Liang <i>et al.</i> , 2014
	ASC	27,04	
	PSC	55,92	
Espinhas de carpa-do-limo <i>(Ctenopharyngodon idella)</i>	ASC	0,7	Wang <i>et al.</i> , 2014 ^a
	PSC	3,5	
Peles de carpa-mrigal <i>(Cirrhinus mrigala)</i>	ASC	4,7	Mahboob, 2015
	PSC	6,5	
Peles de robalo-japonês <i>(Lateolabrax japonicus)</i>	UAC	17,97	Kim <i>et al.</i> , 2013

Legenda: ASC – colagénio solúvel em ácido; PSC – colagénio solúvel em pepsina; SSC – colagénio solúvel numa solução salina; UAC – colagénio extraído com ultrassons.

1.4. Hidrolisados de colagénio

A preparação de hidrolisados proteicos de pescado tem vindo a merecer um interesse crescente nos últimos anos. Esta tecnologia permite valorizar os subprodutos de pescado dado que os hidrolisados proteicos apresentam atividades biológicas diversas que só se manifestam quando determinadas sequências de aminoácidos são libertadas das proteínas por hidrólise. De entre as atividades dos hidrolisados destacam-se as relacionadas com a saúde, nomeadamente no sistema imunológico e na prevenção de doenças cardiovasculares e do sistema nervoso. Os hidrolisados podem ser preparados a partir de todas as proteínas presentes nos vários tecidos do pescado, mas também a partir de proteínas específicas como o colagénio. Os péptidos do colagénio podem ser obtidos por processamento químico, degradação/hidrólise usando enzimas exógenas ou endógenas, fermentação microbiana, sendo ainda produzidos durante a digestão gastrointestinal (Suresh e Prabhu, 2013; Liu *et al.*, 2015).

Os métodos químicos de preparação dos hidrolisados de colagénio podem ser ácidos ou alcalinos. Estes métodos de hidrólise não são dispendiosos, nem exigem uma tecnologia complexa e os tempos de hidrólise são relativamente curtos e aplicáveis em processos industriais. No entanto, estes processos envolvem soluções ácidas ou alcalinas

concentradas, tornando-os ecologicamente inaceitáveis e, por outro lado, reduzem o valor nutricional destes produtos. A hidrólise ácida é realizada normalmente com uma solução concentrada de ácido clorídrico (6 M) a temperaturas de 110 – 120 °C e durante 18 a 48 horas. Na hidrólise alcalina utilizam-se soluções concentradas de hidróxido de sódio ou de potássio a temperaturas elevadas (130 a 180 °C). Porém, este processo pode destruir alguns aminoácidos como a serina, cisteína, histidina e treonina (Anal *et al.*, 2013).

Na hidrólise enzimática do colagénio de origem marinha têm sido utilizadas múltiplas proteases comerciais de origem microbiana tais como as de grau alimentar (como alcalase, flavourzyme, protamex) ou de grau não alimentar (colagenase, proteinase K, metaloproteases, proteases serínicas), provenientes de plantas (papaína, bromelina, ficina) e de animais (por exemplo pepsina, α -quimotripsina, neutrase, tripsina) (Mora *et al.*, 2014; Liu *et al.*, 2015). A hidrólise enzimática provoca a degradação gradual das cadeias polipeptídicas α e β em pequenos péptidos com massas moleculares entre 1 e 4 kDa (Liu *et al.*, 2015).

A irradiação com micro-ondas tem vindo a ser aplicada em processos de hidrólise enzimática como alternativa ao processo de aquecimento convencional. O aquecimento com micro-ondas permitiu realizar a hidrólise enzimática de ligações peptídicas de várias proteínas com o citocromo c, ubiquitina, lisozima ou mioglobina em minutos, enquanto o mesmo processo realizado com aquecimento convencional exigia horas (Pramanik *et al.*, 2002). A eficiência do aquecimento com micro-ondas na digestão de várias proteínas foi também demonstrada por Juan *et al.* (2005) que reduziram o tempo de hidrólise de 16 horas no processo com aquecimento convencional para 5 minutos quando utilizaram o aquecimento com micro-ondas. No entanto, a aplicação de micro-ondas na preparação de hidrolisados proteicos por via enzimática ainda é limitada.

A massa molecular dos péptidos obtidos é um dos fatores mais importantes que determinam as respetivas atividades biológicas. Neste sentido, torna-se necessário recorrer ao método mais adequado de preparação de modo a obter péptidos com a massa molecular e as propriedades funcionais pretendidas (Kim e Wijesekara, 2010; Liu *et al.*, 2015). A distribuição de massas moleculares dos hidrolisados de colagénio depende da respetiva origem, do tipo de enzima utilizado e das condições da hidrólise (Liu *et al.*, 2015).

1.5. Caracterização reológica

A reologia é a ciência que estuda o escoamento e a deformação dos materiais. As determinações reológicas permitem obter informações sobre a forma como um determinado material reage quando sujeito a uma força de carácter mecânico. O comportamento reológico dos materiais é muito variado e complexo, apresentando comportamentos diferentes quando sujeitos a condições diferentes, quer a nível das tensões e da velocidade de deformação em corte quer em função da temperatura ou outras variáveis (Alves, 2003).

A caracterização reológica dos materiais tem subjacente a definição teórica de três estados estruturais da matéria: sólido puro (ou sólido de Hooke), líquido puro (ou líquido de Newton) ou material viscoelástico (Sousa, 2001; Alves, 2003).

O material viscoelástico apresenta, simultaneamente, um comportamento elástico e viscoso, ou seja, manifesta características intermédias entre um fluido e um sólido. Estas duas componentes são caracterizadas pelo módulo complexo dinâmico (G^*) expresso como a razão entre uma tensão sinusoidal e a respetiva deformação. Este módulo resulta de uma relação matemática entre duas componentes: a componente elástica – G' , e a componente viscosa – G'' . A componente elástica ou módulo de conservação, mede a energia que é conservada e depois utilizada na recuperação da deformação quando a tensão é removida, refletindo deste modo a contribuição elástica material. Quando à componente viscosa ou módulo de dissipação, mede a energia que é dissipada no escoamento para vencer o atrito interno, refletindo deste modo a contribuição viscosa (Sousa, 2001; Alves, 2003). Assim, G^* é representado da seguinte forma:

$$G^* = G' + iG''$$

O material viscoelástico apresenta um comportamento não newtoniano, ou seja, quando sujeito a uma dada tensão poderá formar ligações temporárias, ou estruturas internas mais ou menos complexas que permitem formar uma rede mais ou menos organizada sob a forma de emulsão ou gel. Este comportamento pode ser expresso pela dependência da viscosidade em relação à velocidade de deformação: $\eta = f(\dot{\gamma})$, em que a viscosidade para velocidade de deformação nula é designada por viscosidade aparente, η_{ap} (Alves, 2003).

Na figura 6 podemos observar os diferentes comportamentos reológicos quando é aplicada uma dada tensão.

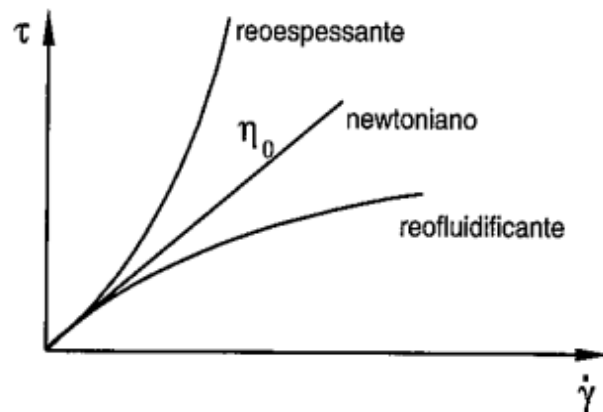


Figura 6 - Curva de tensão em função da velocidade de deformação, representados os diferentes tipos de comportamento reológico. **Fonte:** Bastos, 2013.

Um fluido newtoniano apresenta uma relação proporcional entre a tensão e a velocidade de deformação, apresentando um comportamento distinto dos outros dois comportamentos dos fluidos. Assim, nos fluidos reofluidificantes, a viscosidade aparente diminui com o aumento da velocidade de deformação, sendo o comportamento mais frequente e típico de produtos como iogurtes ou maioneses. Este comportamento resulta da quebra de interações moleculares e do alinhamento das cadeias dos polímeros na direção do escoamento com o aumento do gradiente de velocidade (Alves, 2003; Bastos, 2013). Na figura 7 encontra-se representado uma curva de escoamento típica de uma emulsão com comportamento reofluidificante.

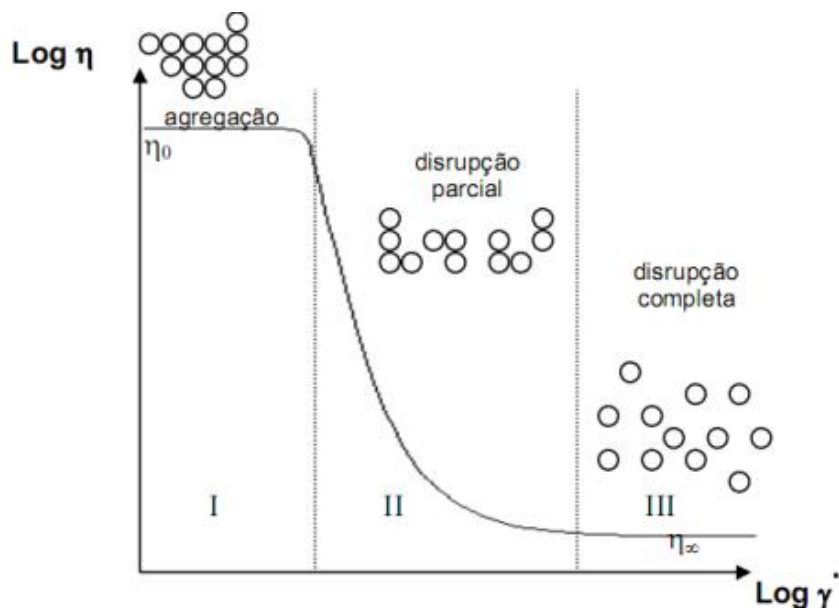


Figura 7 - Curva de viscosidade típica de uma emulsão com comportamento reofluidificante e respetivas mudanças moleculares que ocorrem quando aplicado uma dada velocidade de deformação. **Fonte:**

Bastos, 2013.

A zona I é típica de um fluido newtoniano, que corresponde a uma viscosidade limite, η_0 , e equivale ao valor máximo de viscosidade do sistema naquelas condições. Na zona II verifica-se o comportamento reofluidificante, ocorrendo a diminuição da viscosidade com o aumento da velocidade de formação, devido à destruição contínua da estrutura interna. Por último, na zona III verifica-se novamente um comportamento newtoniano, caracterizado também por uma viscosidade limite, η_∞ , mas neste caso corresponde ao valor mínimo de viscosidade do sistema (Sousa, 2001; Alves, 2003).

Nos materiais que apresentam um comportamento reoespassante, regista-se um aumento da tensão de corte com a velocidade de deformação, sendo o comportamento típico, por exemplo, de uma dispersão de amido em água (Alves, 2003).

Para avaliar o comportamento reológico são realizados dois tipos de testes: testes estacionários e testes oscilatórios. Os testes estacionários consistem na aplicação de um gradiente de tensão ou velocidade de corte unidirecional relativamente à amostra em estudo, sendo usado estes testes para a determinação da viscosidade aparente. Desta forma, esta determinação permite estabelecer as curvas de escoamento. No caso dos testes oscilatórios, estes possibilitam analisar a amostra de uma forma não destrutiva, isto é, à amostra é aplicado uma tensão (ou deformação) que resulta numa função sinusoidal do tempo e regista-se a deformação (ou tensão) resultante. Uma vez que se trata de uma função sinusoidal, e se for aplicada uma deformação linear, o ângulo de perda ou dissipação (δ), varia entre 0 e $\pi/2$, consoante o comportamento viscoelástico se aproximar mais de um sólido ou de um líquido. Contudo, quando $\delta = 0$ e $\delta = \pi/2$ o material tem um comportamento 100 % elástico (predominante sólido) e 100 % viscoso (predominante líquido), respetivamente. Assim, é possível calcular a razão entre a energia dissipada e a energia armazenada a partir da tangente de dissipação ($\tan \delta$), como se encontra na expressão seguinte (Alves, 2003).

$$\tan \delta = \frac{G''}{G'}$$

Como já referido anteriormente, o colagénio possui diversas aplicações sendo bastante procurado pela indústria alimentar devido à sua capacidade em gelificar (Montero e Borderías, 1990). Assim, a partir da caracterização reológica é possível avaliar as propriedades viscoelásticas do colagénio extraído e averiguar sobre a sua aplicação tecnológica a nível alimentar.

1.6. Situação do peixe-espada-preto em Portugal

Em 2015, as capturas da frota portuguesa atingiram as 194 164 toneladas de pescado, o que representou um acréscimo de 5,6 % na produção da pesca nacional, relativamente a 2014 (INE, 2016).

Em Portugal continental, o peixe-espada-preto, *Aphanopus carbo*, (PEP) é capturado ao longo da costa de Sesimbra até Matosinhos, de forma artesanal e tradicional, utilizando a técnica do palangre (aparelho de anzóis). Esta forma de pescar é altamente seletiva e considerada a mais sustentável para o meio ambiente (ArtesanalPesca, 2016). A nível nacional, é em Sesimbra que se concentra a maior descarga de PEP, correspondendo a 2 513 de toneladas, o que equivale a quase toda a captura desta espécie em Portugal continental. Na região da Madeira, o PEP é um dos peixes mais procurados, correspondendo a cerca de 34 % dos desembarques totais (INE, 2016).

Na tabela 3, encontram-se as quantidades e o valor do PEP desembarcado no continente e nas regiões autónomas da Madeira e dos Açores.

Tabela 3 – Quantidade e valor dos desembarques de peixe-espada-preto. **Fonte:** INE, 2016.

	Quantidade (t)	Valor (10 ³ €)
Continente	127 026	217 316
Peixe-espada-preto	2 527	7 372
Açores	8 164	28 033
Peixe-espada-preto	7	24
Madeira	5 641	15 635
Peixe-espada-preto	1 902	7 172

Na empresa ArtesanalPesca, situada em Sesimbra, produz-se filetes despelados desta espécie, resultando subprodutos constituídos por peles, cabeça, vísceras, espinhas e aparas que, em 2012, atingiram 210 toneladas. Este material é essencialmente utilizado na produção de farinha e óleo de peixe que apresentam baixo valor comercial. O processo de produção permite obter as peles separadas do outro material o que representa uma vantagem para a sua posterior utilização. Por outro lado, a pele constitui uma boa fonte de colagénio, sendo expectável que apresente propriedades diferentes do colagénio de espécies de superfície por tratar-se de um peixe de profundidade.

1.7. Objetivo

O colagénio é uma proteína presente nos subprodutos da indústria do pescado, que tem vindo a ser procurado e valorizado devido às suas características e aplicações em áreas como a alimentar, farmacêutica e cosmética. Ainda a partir do colagénio, é possível preparar hidrolisados que apresentam propriedades biológicas diversas com especial interesse na área da saúde.

O presente trabalho teve como objetivo: (i) a extração de colagénio de peles de PEP, realizada por via ácida (ASC) e com pepsina (PSC); (ii) a caracterização do colagénio ASC e PSC; (iii) a preparação de hidrolisados de colagénio por via enzimática com aquecimento por micro-ondas; (iv) a caracterização dos hidrolisados obtidos e (v) a avaliação da atividade antioxidante dos hidrolisados.

2. Materiais e métodos

2.1. Materiais

As peles de PEP utilizadas para a extração do colagénio neste trabalho são resultantes do processamento de filetes de peixe e foram fornecidas gentilmente pela empresa ArtesanalPesca. A matéria-prima foi conservada à temperatura de cerca de -18 °C no IPMA até posterior utilização.

Para o corrente trabalho foram utilizadas enzimas hidrolíticas como a pepsina (SigmaAldrich, pepsina extraída da mucosa gástrica de suíno, atividade da enzima: ≥ 400 unidades/mg de proteína), a tripsina (SigmaAldrich, tripsina pancreática de suíno, tipo IX-S, 000 BAEU unidade/mg de proteína) e protamex (mistura de endopeptidases e exopeptidases extraídas a partir de *Bacillus sp.*; Novozymes). Recorreu-se também à utilização de aminoácidos como norvalina (SigmaAldrich) e sarcosina (SigmaAldrich, 98%).

2.2. Métodos

2.2.1. Extração do colagénio a partir das peles de PEP

De modo a facilitar a extração do colagénio das peles de PEP, foi necessário previamente cortar as peles em pequenos fragmentos. A extração de colagénio a partir das peles foi feita de acordo com o método descrito por Nagai e Suzuki (2000) e Jongjareonrak *et al.* (2005), com algumas alterações.

Pesou-se 150 g de peles previamente fragmentadas em pequenos pedaços. De seguida, removeu-se todo o material da fração não-colagenosa, através da adição de hidróxido de sódio 0,1 M numa proporção de 1:30 (m/v) durante 24 h a 4 °C, com agitação ligeira. Esta solução foi mudada a cada 8 h. Ao fim das 24 h, lavou-se as peles com água destilada até pH neutro ou ligeiramente alcalino e triturou-se de forma a obter uma pasta o mais homogénea possível.

Após a eliminação do material não-colagenoso, removeu-se a gordura com adição de álcool butílico a 10 % numa proporção de 1:30 (m/v) durante 24 h com agitação ligeira a 4 °C. Esta solução foi trocada a cada 8 h. O material resultante foi coado e lavado com água destilada. Adicionou-se ácido acético 0,5 M numa proporção de 1:30 (m/v), e manteve-se a mistura durante três dias com agitação ligeira, a 4 °C. A mistura foi centrifugada a 20 000 g durante 45 min a 4 °C e recolheu-se o sobrenadante. A centrifugação foi realizada num equipamento KUBOTA 6800 (KUBOTA, Japão). Ao *pellet* resultante adicionou-se novamente ácido acético 0,5 M numa proporção de 1:10 (m/v), e manteve-se em agitação ligeira a 4 °C, durante dois dias. A mistura foi centrifugada nas mesmas condições

anteriores e o sobrenadante foi recolhido e misturado com o obtido anteriormente. O resíduo resultante será usado na extração com pepsina.

Com o objetivo de precipitar o colagénio, à combinação dos sobrenadantes foi adicionado NaCl de modo a obter-se uma concentração final de 2,6 M e ajustou-se o pH a 7,5, com Tris 0,05 M. A solução obtida foi centrifugada a 20 000 g, durante 45 min a 4 °C e o *pellet* resultante foi solubilizado com 10 volumes de ácido acético 0,5 M. De seguida realizou-se uma diálise contra ácido acético 0,1 M durante 24 h e depois contra água. O dialisado obtido foi liofilizado e foi denominado de colagénio solúvel em ácido (ASC). A liofilização foi realizada num equipamento Heto PowerDry LL300 (ThermoScientific, USA).

Para a extração com pepsina, ao resíduo adicionou-se dois volumes de ácido acético 0,5 M e pepsina a 0,1 % (m/m). A mistura foi mantida durante 24 h com agitação ligeira a 4 °C. Após este período, centrifugou-se durante 45 min, a 4 °C e a 20 000 g. O sobrenadante obtido foi sujeito a diálise contra tampão fosfato de sódio 0,02 M (pH 7,2), durante 24 h. A solução de tampão foi mudada frequentemente. O dialisado obtido foi centrifugado (condições iguais à centrifugação anterior) e o *pellet* resultante foi solubilizado com 10 volumes de ácido acético 0,5 M. Posteriormente, adicionou-se NaCl até uma concentração final de 2,6 M, tendo sido ajustado o pH a 7,5 antes da precipitação. A suspensão foi centrifugada a 20 000 g durante 45 min, a 4 °C, e o precipitado redissolvido em 10 volumes de ácido acético 0,5 M. A solução foi dialisada contra água destilada. O produto obtido foi liofilizado, sendo denominado de colagénio solúvel em pepsina (PSC).

Os ensaios foram realizados em duplicado e foram designados da seguinte forma:

Ensaio	1ª Réplica	2ª Réplica
1	ASC 1.1	ASC 1.2
	PSC 1.1	PSC 1.2
2	ASC 2.1	PSC 2.2
	PSC 2.1	ASC 2.2

As condições para a extração de ASC não foram alteradas nos dois ensaios, mas foram testadas dois tempos de atuação da pepsina, 24 e 48 h. Nos fluxogramas seguintes, encontram-se esquematizados os processos de obtenção do colagénio solúvel em ácido (ASC) (Fig. 8) e colagénio solúvel em pepsina (PSC) (Fig. 9).

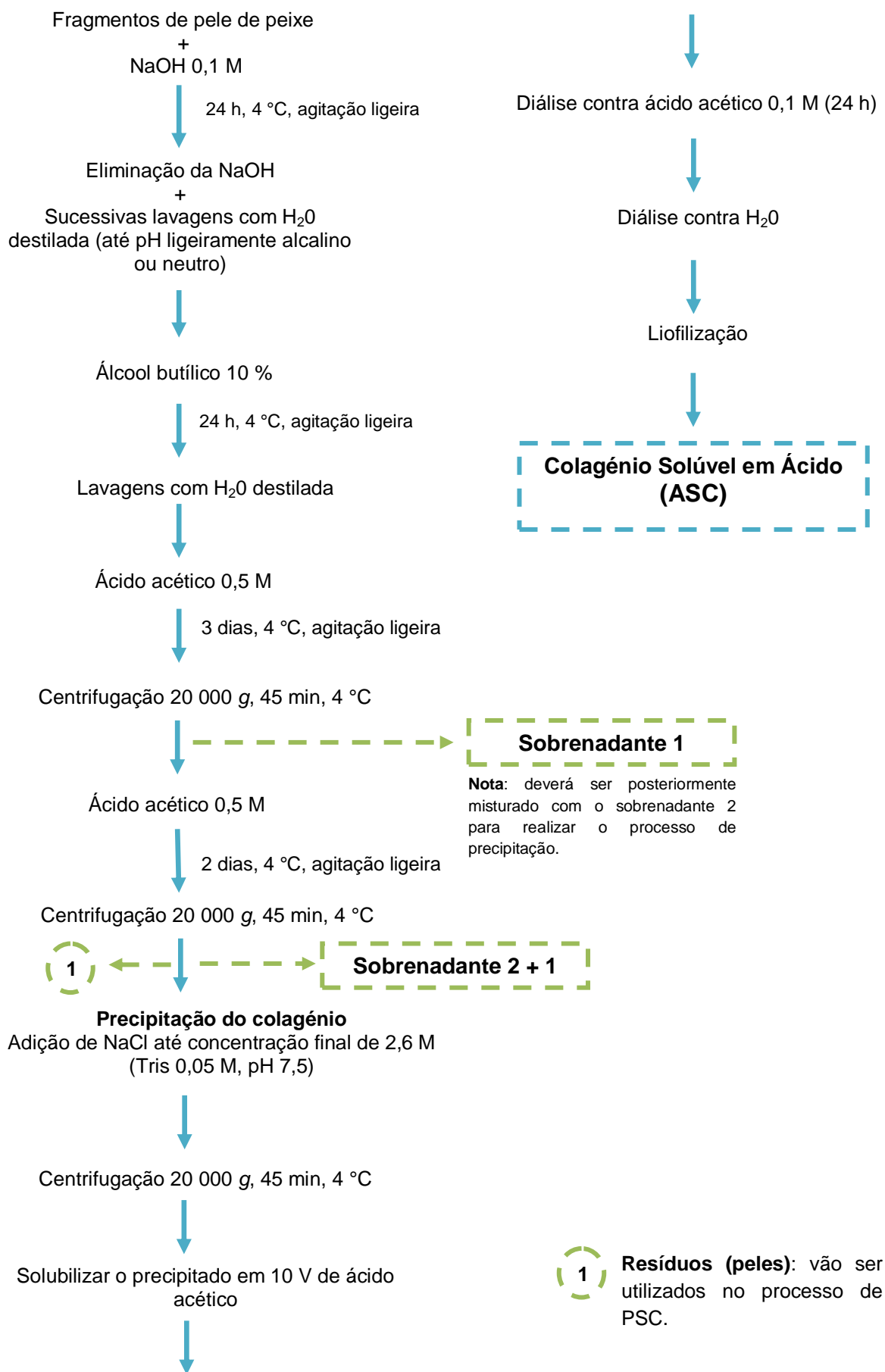


Figura 8 - Esquematização do processo de extração de colagénio solúvel em ácido (ASC).

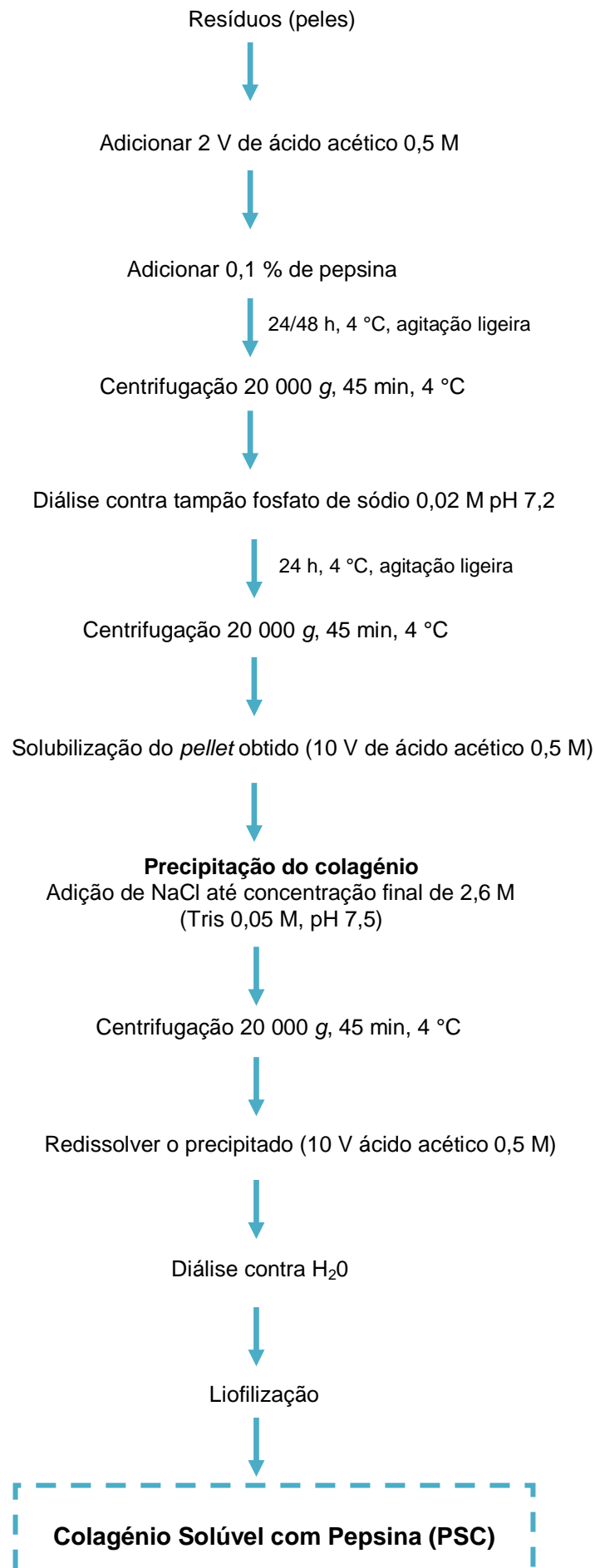


Figura 9 - Esquemática do processo de extração de colagénio solúvel em pepsina (PSC).

2.2.2. Composição química aproximada

2.2.2.1 Determinação da humidade

O teor de humidade da matéria-prima foi determinado de acordo com o procedimento descrito na norma portuguesa NP 2282 (2009). Para esse efeito, pesou-se 10 g das peles de PEP e secou-se na estufa a 105 °C durante 24 h. Ao fim deste tempo, retirou-se as amostras e colocou-se de imediato num exsiccador, deixando arrefecer. Procedeu-se à pesagem das amostras secas. A determinação foi realizada em triplicado.

A humidade da amostra é calculada pela seguinte fórmula:

$$\left(\frac{m_2 - m_3}{m_2 - m_1}\right) \times 100$$

Onde:

m_1 – a massa, expressa em grama, da caixa de Petri;

m_2 – a massa, expressa em grama, da caixa de Petri com a amostra;

m_3 – a massa, expressa em grama, da caixa de Petri com amostra após a secagem.

2.2.2.2 Determinação da cinza total

Para a determinação do teor de cinza total da matéria-prima foi seguido o procedimento descrito na norma portuguesa NP 2032 (2009).

Para a realização do ensaio, colocou-se os cadinhos durante a noite anterior numa mufla a 100 °C para posterior utilização. Após a secagem, pesou-se 10 g das peles de PEP para os cadinhos. Colocou-se os cadinhos com a amostra na mufla à temperatura inicial de 200 °C. A temperatura foi aumentada gradualmente até os 500 °C e as amostras foram mantidas durante a noite a esta temperatura. No dia seguinte, retirou-se os cadinhos da mufla e foram arrefecidos em exsiccador. Depois do arrefecimento, pesaram-se os cadinhos e foram colocados novamente na mufla a 500 °C durante 30 min. Esta operação foi repetida as vezes necessárias até pesagens não diferirem entre si em mais de 1 mg. Determinou-se a cinza em duplicado.

Os resultados do teor de cinza são expressos em grama por 100 grama de amostra e são obtidos pela seguinte equação:

$$\left(\frac{m_3 - m_1}{m_2 - m_1}\right) \times 100$$

Em que:

m_1 – a massa, expressa em grama, do cadinho;

m_2 – a massa, expressa em grama, do cadinho e da amostra;

m_3 – a massa, expressa em grama, do cadinho e do resíduo após secagem.

2.2.2.3 Determinação da gordura

A determinação da gordura da matéria-prima foi realizada de acordo com a metodologia descrita por Bligh e Dyer (1959), com algumas alterações à metodologia.

Pesou-se 1 g de peles de PEP e adicionou-se 5 ml de metanol:clorofórmio (2:1). Homogeneizou-se no Polytron PT 3100 D (Kinematica AG, Suíça) durante 1 min e adicionou-se 1 ml de solução saturada de NaCl, seguindo de agitação durante 30 s. Adicionou-se 2 ml de clorofórmio e homogeneizou-se durante 30 s. De seguida, adicionou-se 2 ml de água Mili-Q e homogeneizou-se durante 1 min. Centrifugou-se o homogeneizado numa micro-centrifugadora 2K15 (Sigma, Alemanha) a 2 152 g durante 10 min, a 4 °C. Após a centrifugação, retirou-se a fase aquosa e transferiu-se a fase orgânica para tubos com sulfato de sódio anidro. Centrifugou-se novamente a fase orgânica com sulfato de sódio anidro a 2 152 g durante 3 min, a 4 °C. Recolheu-se a fase orgânica para um balão de pêra previamente tarado e filtrou-se por uma coluna de algodão e sulfato de sódio anidro. Ao tubo com sulfato de sódio anidro, adicionou-se 2 ml de clorofórmio e agitou-se numa rotação baixa no vortex e centrifugou-se novamente a 2 152 g durante 3 min, a 4 °C. Recolheu-se novamente o extrato para o balão de pêra. Lavou-se a coluna de algodão e sulfato de sódio anidro e evaporou-se o clorofórmio da pêra no rotavapor num banho com uma temperatura de 45 °C e 170 rpm. Secou-se a amostra com azoto durante 1 min para garantir que não havia clorofórmio na amostra. Esta determinação foi realizada em duplicado.

O resultado do teor de gordura deverá ser expresso em percentagem e é obtido pela seguinte expressão:

$$\left(\frac{m_2 - m_1}{m_3} \right) \times 100$$

Onde:

m_1 - a massa, expressa em grama, da pêra;

m_2 – a massa, expressa em grama, da pêra com a gordura final;

m_3 – a massa, expressa em grama, da amostra.

2.2.2.4 Determinação da proteína total

A determinação da proteína total da matéria-prima foi efetuada pelo método de Dumas descrito por Saint-Denis e Goupy (2004). Nesta determinação usou-se o equipamento Protein/Nitrogen Analyser FP-528 (LECO, Alemanha).

Pesaram-se 150 mg das peles de PEP, que depois foram colocadas no equipamento. Procedeu-se à leitura onde será determinado o azoto total por combustão. A quantificação é realizada com um fator de conversão igual a 6,25, obtendo-se desta forma o teor de proteína bruta. Para o colagénio obtido da extração, foi realizado o mesmo método e o mesmo fator de conversão, mas apenas pesou-se 50 mg de cada amostra.

Todas as determinações foram realizadas em triplicado.

2.2.3. Determinação dos aminoácidos

A determinação dos aminoácidos do colagénio extraído das peles de PEP (ASC do segundo ensaio e PSC 2.1) de acordo com AOAC (1996).

Pesou-se uma quantidade de amostra que tinha entre 1,5 a 2,0 mg de azoto e adicionou-se 1 ml de padrão interno ISTD ($10 \text{ nmol}\mu\text{l}^{-1}$ contendo norvalina e sarcosina). Posteriormente adicionou-se 3 ml de HCl 6 M contendo 0,1 % de fenol. Colocou-se os tubos num excicador, juntamente com uma cápsula com lentilhas de NaOH e fez-se vácuo durante 10 a 15 min. De seguida, injetou-se azoto nos tubos durante 3 min, antes de os fechar de forma a criar uma atmosfera inerte. Os tubos foram ser colocados numa estufa a uma temperatura entre 110-115 °C e deixou-se ocorrer a hidrólise durante 24 h.

Após este período, e depois de se deixar arrefecer os tubos à temperatura ambiente, filtrou-se o hidrolisado e adicionou-se 2,5 ml de NaOH 6 M e perpez-se o volume a 20 ml com água. De seguida, filtrou-se as amostras para um vial. A separação foi realizada num equipamento HPLC Agilent 1100 (Agilent Palo Alton, CA) com derivatização da pré-coluna usando o-ftalaldeído (OPA) e cloroformato de 9-fluorenilmetilo (FMOC), pré-coluna Phenomenex Gemini ODS C18 (4 x 3 mm) e coluna Phenomenex Gemini ODS C18 110 Å (4,6 x 150 mm, 5 μm).

Os solventes e as condições de gradiente foram descritas por Henderson *et al.* (2000). Fixou-se os comprimentos de onda de deteção no UV (338 nm a 262 nm) e fluorescência (340/450 e 266/305). Identificou-se e quantificou-se os aminoácidos comparando-os com os tempos de retenção e as áreas dos picos de aminoácidos padrão com um *software* Agilent ChemStation (Agilent, USA). Usou-se a norvalina e sarcosina como padrões internos.

As determinações foram efetuadas em triplicado e os resultados são expressos em resíduos/1 000 resíduos.

2.2.4. Eletroforese SDS-PAGE

O perfil proteico do colagénio foi analisado por eletroforese em SDS-PAGE seguindo a metodologia descrita por Jongjareonrak *et al.* (2005). Esta metodologia permite caracterizar as frações proteicas existentes em relação à sua massa molar através da aplicação de uma diferença de potencial que permite a separação das frações consoante o seu tamanho.

Para a realização da eletroforese SDS-PAGE, dissolveu-se as amostras de colagénio em tampão fosfato 0,02 M a pH 7,2 contendo SDS a 1 % e ureia 3,5 M. Para uma solubilização completa as amostras preparadas foram deixadas em agitação ligeira durante cerca 8 h (*overnight*), a 4 °C. Após este período, centrifugou-se as soluções a 3 000 g durante 3 min, a 4 °C. Ao sobrenadante adicionou-se na proporção de 1:1 tampão Tris-HCl 0,5 M a pH 6,8 contendo 4 % de SDS, 20 % de glicerol e 10 % de 2-mercaptoetanol (β MCE). As amostras foram aplicadas no gel ExcelGel™ SDS, gradiente de poliacrilamida de 8 a 18 %, com uma gama de separação entre 6,5 a 300 kDa. De modo a estimar a massa molecular das proteínas analisadas foi utilizado um *kit* de proteínas com uma gama de massas moleculares entre 53 e 220 kDa (High Molecular Weight, GE Healthcare). A corrida decorreu a 600 V, 50 mA e 30 W.

2.2.5. Solubilidade

2.2.5.1 Efeito no pH na solubilidade

O efeito do pH na solubilidade do colagénio foi realizado de acordo com o método descrito em Jongjareonrak *et al.* (2005), com algumas alterações. A solubilidade é avaliada através da quantidade de proteína que é determinada em cada uma das frações de sobrenadante a diferente pH.

Preparou-se uma solução de colagénio 6 mg.ml⁻¹ em ácido acético que ficou a solubilizar durante cerca de 16 h. Para eliminar os materiais não solúveis, centrifugou-se a solução a 10 000 g durante 30 min a 4°C. Retirou-se 8 ml desta solução e ajustou-se aos diferentes pH (2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 e 10) com NaOH ou HCl. A solução ficou em agitação ligeira durante 30 min a 4°C. O volume das soluções foi ajustado a 10 ml com água destilada com o mesmo pH da solução. De seguida, centrifugou-se durante 30 min a 10 000 g a 4°C. Filtrou-se o sobrenadante obtido e determinou-se a proteína por método de Bradford nas condições referidas em 2.2.5.3. Este ensaio de solubilidade foi apenas efetuado para a fração de colagénio ASC.

Os resultados são expressos em percentagem relativa e realizou-se o ensaio com cinco medições.

2.2.5.2 Efeito da concentração de sal (NaCl) na solubilidade

O efeito da concentração de sal na solubilidade do colagénio extraído foi determinado de acordo com o método descrito em Jongjareonrak *et al.* (2005). O mesmo que no ponto anterior, a solubilidade é avaliada através da quantidade de proteína que é determinada em cada uma das frações de sobrenadante a diferentes concentrações de sal.

Preparou-se uma solução de colagénio 6 mg.ml^{-1} em ácido acético que ficou a solubilizar durante cerca de 16 h. Para eliminar material não solúvel, centrifugou-se a solução a $10\,000 \text{ g}$ durante 30 min a 4°C . Retiraram-se 5 ml da solução preparada e adicionaram-se 2 ml das diferentes concentrações de NaCl (0, 3,5, 7, 10,5, 14, 17,5 e 21 %) preparadas em ácido acético 0,5 M (5°C). Deixou-se em agitação ligeira durante 30 min a 4°C . De seguida, centrifugou-se durante 30 min a $10\,000 \text{ g}$, a 4°C . Filtrou-se o sobrenadante obtido e determinou-se a quantidade de proteína por método de Bradford, nas condições referidas em 2.2.5.3. Este ensaio de solubilidade foi apenas efetuado para a fração de colagénio ASC.

Os resultados são expressos em percentagem relativa e efetuou-se cinco medições.

2.2.5.3 Determinação da proteína por método de Bradford

A determinação da proteína solúvel para os ensaios de solubilidade foi realizada pelo método de Bradford e utilizou-se a metodologia descrita por López *et al.* (1993), com algumas alterações. Recorreu-se ao leitor de microplacas modelo 680 (Bio-Rad, Itália) para efetuar a leitura. À microplaca, adicionou-se $200 \mu\text{l}$ de reagente de Bradford (Azul Comassie G-250), $10 \mu\text{l}$ de amostra de colagénio e $10 \mu\text{l}$ de SDS para uma concentração final de 0,0035 %. Antes da leitura da placa, as amostras foram agitadas durante 15 s e realizou-se a leitura de absorvância a 595 nm. Foi utilizada a proteína soro de bovino como proteína padrão ($y = 0,298x + 0,0057$, $R^2 = 0,99$), numa gama de concentração de 0 a $0,5 \text{ mg.ml}^{-1}$.

2.2.6. Espectro Ultravioleta

O espectro ultravioleta dá uma indicação sobre a pureza da amostra, ou seja, a presença de proteínas não-colagenosas.

As amostras ASC foram solubilizadas em ácido acético 0,5 M numa concentração de 1 mg.ml^{-1} . Centrifugou-se a solução sempre que se apresentava turva. Foi feito um varrimento de comprimento de onda entre 200 e 400 nm num espectrofotómetro HELYOS (Unicam).

2.2.7. Determinação dos parâmetros da cor

Para a determinação da cor das amostras de colagénio utilizou-se o colorímetro CHROMA METER CR - 400/410 (Konica Minolta, Japão) usando uma fonte luminosa padrão D65. Esta avaliação destina-se a verificar os valores de brancura através de parâmetros de qualidade, sendo esses parâmetros L^* , a^* e b^* definidos pelo sistema CIELAB.

A coordenada L^* mede a luminosidade da amostra e varia entre 0 % a 100 %, ou seja, 0 % corresponde ao menos luminoso e 100 % ao mais luminoso. A coordenada a^* varia de -60 a +60, onde valores perto de -60 estão perto da cor verde e vermelho quando os valores se aproximam de +60. A coordenada b^* varia entre -60, correspondendo ao azul, e +60 ao amarelo. Na figura 10, encontra-se representado o sistema CIELAB.

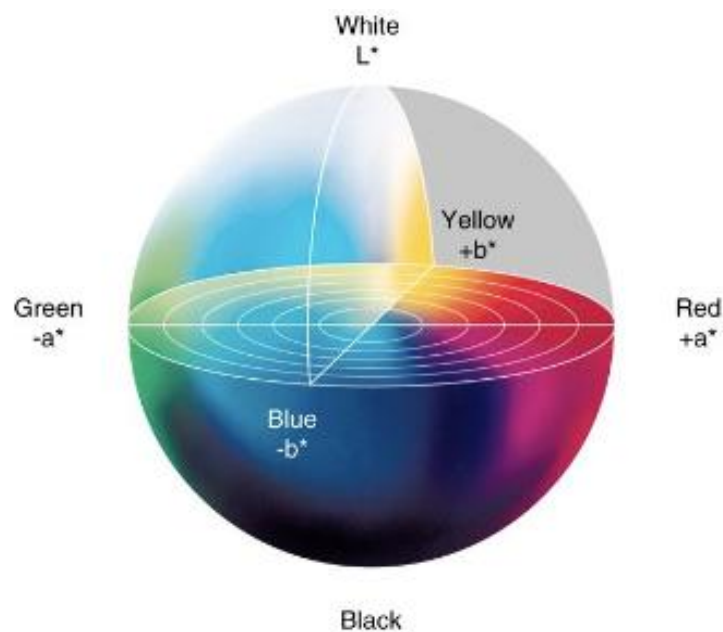


Figura 10 – Representação espacial da cor segundo os parâmetros L^* , a^* e b^* .

Para cada amostra ASC e PSC foram efetuadas cinco e três medições, respetivamente. O equipamento foi equilibrado com um padrão branco com os seguintes valores: $L^* = 97,79$; $a^* = -0,02$; $b^* = 1,84$.

De forma a obter uma melhor avaliação sobre a cor, os parâmetros foram combinados para obter valores de brancura (W – *Whiteness*), dados pela seguinte expressão:

$$W = 100 - \sqrt{(100 - L^{*2}) + a^{*2} + b^{*2}}$$

2.2.8. Avaliação do comportamento reológico

O comportamento viscoelástico do colagénio extraído foi avaliado num reómetro de tensão controlada HAAKE MARS (ThermoScientific, USA), para avaliação dos parâmetros de viscosidade e estruturação dos géis.

Para isso, foi preparada uma solução de colagénio de $8 \text{ mg}\cdot\text{ml}^{-1}$ em ácido acético 0,5 M ($\approx \text{pH } 2$) e tampão fosfato de sódio 0,2 M a pH 7. Inicialmente realizou-se um teste de varrimento em tensão de modo a garantir que todos os testes eram realizados na zona de viscoelasticidade linear, fixando-se assim o valor de frequência para 1 Hz e tensão igual a 0,5 Pa. O sensor utilizado foi cone-prato com um ângulo de 1° e 60 mm. Após estabilização da temperatura das amostras foram realizados os seguintes testes:

1. **Varrimento em temperatura de 5 °C a 90 °C:** procedeu-se ao aquecimento da amostra a partir dos 5 °C até aos 90 °C de modo contínuo, a uma frequência e tensão constante, durante cerca de 30 min;
2. **Varrimento em temperatura de 90 °C a 5 °C:** posteriormente realizou-se um arrefecimento dos 90 °C aos 5 °C de modo contínuo, com uma frequência e tensão constante (1 Hz e 0,5 Pa), durante cerca de 30 min;
3. **Varrimento em tempo a 5 °C:** durante 1 h a uma frequência constante de 1 Hz e tensão a 0,5 Pa. Neste passo é registado os módulos de conservação e dissipação, também designados por cinéticas de maturação;
4. **Varrimento em frequência a 5 °C:** por último, é efetuado um teste para obter o espectro mecânico da amostra, para tal utilizou-se um intervalo de frequência entre 0,01 Hz a 1000 Hz e tensão de 1 Pa.

Realizou-se o ensaio em duplicado.

Para avaliar a viscosidade das amostras de colagénio foram realizados testes com o sensor cone-prato com um ângulo de 1° e 35 mm. Para tal, estabilizou-se a amostra durante 5 min a 5 °C e no passo seguinte variou-se a taxa de formação entre 10^{-8} s^{-1} e 500 s^{-1} , durante 11 min a 5 °C.

Efetuuou-se também testes de viscosidade em função da temperatura. A amostra foi estabilizada a 5 °C durante 5 min e após esse período aqueceu-se até aos 90 °C, a uma taxa de formação constante de 5 s^{-1} . Em seguida, arrefeceu-se a amostra dos 90 °C para os 5 °C, a uma taxa de formação igual a 5 s^{-1} .

Os ensaios da viscosidade foram realizados em triplicado.

O comportamento de um fluido não-newtoniano foi descrito pela Lei de Potência (ou Modelo de Ostwald-de Waele), onde a equação desta lei pode vir em função da viscosidade, e é expressa da seguinte forma:

$$\eta = k \dot{\gamma}^{n-1}$$

Em que η é a viscosidade aparente (Pa.s), $\dot{\gamma}$ a velocidade de deformação (s^{-1}), k a consistência ($Pa.s^n$) e n o índice de escoamento que varia entre 0 e 1.

A partir das medições da viscosidade é possível retirar o valor da temperatura da desnaturação dinâmica (T_{dd}) das soluções de colagénio. Quando a viscosidade é em função da temperatura, a T_{dd} corresponde à viscosidade da solução quando diminui para cerca de 50 % da viscosidade inicial. Por outro lado, a T_{dd} pode ser calculado a partir da $tg \delta$ em função da temperatura que corresponde ao pico máximo de temperatura.

2.2.9. Hidrolisados enzimáticos de colagénio

A preparação de hidrolisados a partir do colagénio extraído das peles de PEP foi realizada num equipamento micro-ondas MARS 5 (CEM, USA), que permitia controlar a temperatura, o tempo de reação e de inativação da enzima. Nas hidrólises com as diferentes enzimas, utilizou-se 500 mg de colagénio ASC, 1 e 3 % de enzima, 25 ml de solução, tendo sido realizadas nas condições referidas na tabela 4 durante 10 min. A inativação das enzimas foi realizada em 90 °C durante 15 min.

Tabela 4 – Condições seguidas na hidrólise do colagénio.

Enzima	Temperatura (°C)	pH	Solução
Pepsina	37	≈ 3	Ácido acético 0,5 M
Protamex	50	7	Tampão fosfato 0,2 M
Tripsina	37	8	Tampão fosfato 0,2 M

Após a inativação da enzima, centrifugou-se a mistura reacional a 10 000 g, durante 15 min e filtrou-se o sobrenadante por filtro com porosidade de 0,45 μm .

O filtrado foi injetado num FPLC AKTA (Amersham Biosciences, Suécia) para a determinação do perfil de péptidos. A separação foi obtida numa coluna Superdex Peptide 10/300 GL, utilizando 30 % acetonitrilo e 0,1 % de ácido trifluoroacético como eluente, a uma taxa de fluxo de 0,5 $mlmin^{-1}$. A deteção dos péptidos é efetuada por UV a 280 nm. A determinação das massas moleculares dos péptidos foi feita recorrendo-se a uma reta de calibração obtida com os seguintes padrões da Amersham Biosciences: ribonuclease A

(13 700 Da), aprotinina (6 500 Da), angiotensina I (1 296 Da), triglicina (189 Da) e glicina (75 Da).

Após a execução do ensaio anterior, selecionou-se a tripsina para realizar um ensaio em maior escala, seguindo-se o procedimento que se encontra na figura 11.

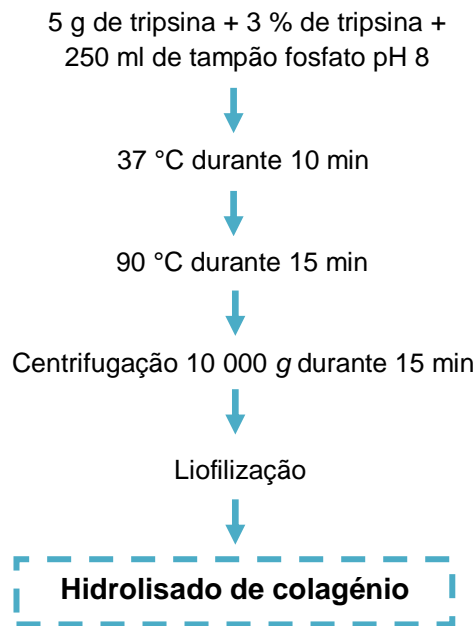


Figura 11 - Esquematisação do processo de obtenção de hidrolisados de colagénio a partir de colagénio ASC das peles PEP.

2.2.9.1 Grau de Hidrólise

Na determinação do grau de hidrólise do hidrolisado de colagénio obtidos, seguiu-se a metodologia descrita por Nielsen *et al.* (2001). Preparou-se uma solução de hidrolisado de colagénio de 4 mg.ml^{-1} e a $400 \mu\text{l}$ desta solução, foram adicionados 3 ml de *o*-ftaldeído (OPA) 6 mM (contendo 1% SDS, DTT $5,7 \text{ mM}$ e tetraborato de disódio $0,17 \text{ M}$). A mistura foi agitada durante 5 s em vortex e após 2 min em repouso, procedeu-se à leitura da absorvância a 340 nm .

O branco foi analisado da mesma maneira mas em vez de amostra, adicionou-se água. No ensaio foi usado como controlo a serina ($0,1 \text{ mg.ml}^{-1}$), cujo valor de absorvância deve situar-se em cerca $0,8$.

O cálculo para o grau de hidrólise (GH) foi realizado de acordo com a seguinte expressão:

$$GH (\%) = \left(\left(\frac{Abs_{amostra} - Abs_{branco}}{Abs_{serina} - Abs_{branco}} \right) \times \left(\frac{0,9516 \times 10}{m \times N \times 6,25} \right) - 0,4 \right) \times \frac{100}{8,6}$$

A determinação foi realizada em triplicado.

2.2.9.2 Atividade Antioxidante (DPPH, ABTS e Poder Redutor)

A avaliação da atividade antioxidante do hidrolisado de colagénio foi realizada pelos métodos de atividade antiradicalar do DPPH e do ABTS. Estes baseiam-se na capacidade de uma substância neutralizar radicais livres do α, α -difeníl- β -picrilhidrazilo (DPPH) e do 2,2'-azino-bis (ácido 3-etilbenzotiazolina-6-sulfónico) (ABTS). Ainda foi usada outra metodologia para avaliar a atividade antioxidante, o poder redutor.

O método de DPPH utilizado foi descrito por Shimada *et al.* (1992), com algumas modificações mencionadas por Picot *et al.* (2010). Às diferentes soluções de hidrolisado preparadas (1, 2, 5, 10, 20, 30, 40 e 50 mg.ml⁻¹), adicionou-se a 1 ml de cada solução, 1 ml da solução DPPH 0,1 mM. Agitou-se em vortex e colocou-se a incubar durante 1 h à temperatura ambiente, com agitação. De seguida, centrifugou-se as diferentes amostras a 10 000 g, durante 10 min, recolheu-se o sobrenadante e leu-se a absorvância a 517 nm.

A atividade antiradicalar do hidrolisado de colagénio foi calculada através da seguinte expressão:

$$\text{Inibição do DPPH (\%)} = \frac{Abs_{branco} - Abs_{amostra}}{Abs_{branco}} \times 100$$

O método do ABTS utilizado foi descrito por Re *et al.* (1999). Preparou-se soluções do hidrolisado com diferentes concentrações (1, 2, 5, 10, 20, 30, 40 e 50 mg.ml⁻¹) e adicionou-se a 20 μ l de cada solução, 2 ml da solução ABTS 7mM. Agitou-se em vortex e colocou-se a incubar durante 6 min, a 30 °C no escuro. De seguida, leu-se a absorvância a 734 nm.

A atividade antiradicalar pelo método do ABTS do hidrolisado foi calculada pela expressão anteriormente mencionada e efetuou-se a determinação em triplicado.

Para a determinação do poder redutor, foi utilizado a metodologia descrita por Oyaizu (1988). Prepararam-se soluções do hidrolisado com diferentes concentrações 1, 2, 5, 10, 20, 30, 40 e 50 mg.ml⁻¹ e adicionou-se a 1 ml de cada solução, 1 ml de tampão fosfato 0,2 M, pH 6,6 e 1 ml de ferricianeto de potássio 1 %. A mistura foi incubada a 50 °C durante 20 min

e adicionou-se 1 ml de ácido tricloroacético (TCA) 10 %. De seguida, centrifugou-se as diferentes amostras a 1 500 g, durante 10 min. Retirou-se 2 ml de sobrenadante das amostras e adicionou-se 2 ml de água e 400 µl de cloreto férrico 0,1 %. Incubou-se a mistura durante 10 min à temperatura ambiente. Por fim, leu-se a absorvância a 700 nm. Determinou-se o poder redutor em triplicado.

2.2.10. Análise estatística

O tratamento estatístico foi realizado no *software* Statistica, vers. 7.0, Stat Soft, Inc. A comparação entre amostras foi realizada através da análise de variância – ANOVA e a verificação dos pressupostos deste teste, normalidade e homogeneidade de variâncias, foi efetuada através da aplicação dos testes de Kolmogorov-Smirnov e de Levene, respetivamente. Na comparação múltipla aplicou-se o teste Tukey HSD e o teste de Unequal N HSD. O nível de significância (α) para os testes estatísticos efetuados, foi de 0,05.

3. Apresentação e Discussão de Resultados

3.1. Composição química aproximada da matéria-prima

A composição química da pele de PEP e de outras espécies apresenta-se na tabela 5. O teor de humidade da pele PEP situa-se na gama de valores referidos para outras espécies. Na pele desta espécie destaca-se o teor de gordura que é consideravelmente mais elevado do que nas outras espécies. O baixo teor em cinza está certamente relacionado com o facto da pele do PEP ser lisa e não possuir escamas. O teor em proteína é relativamente mais baixo do que o referido para a pele de outras espécies, em virtude do elevado teor de gordura.

Tabela 5 - Composição química para as peles de PEP e outras espécies.

Espécie	Humidade (%)	Gordura (%)	Proteína (%)	Cinza (%)	Referência
PEP	64,1 ± 0,1	21,8 ± 1,03	11,8 ± 0,5	0,67 ± 0,03	-
Peixe-balão-de-espinhos-longos (<i>Diodon holocanthus</i>)	62,23	0,73	21,95	15,87	Huang <i>et al.</i> , 2011
<i>Chiloscyllium punctatum</i>	61,96	0,19	24,74	12,12	Kittiphattanabawon <i>et al.</i> , 2010
<i>Priacanthus tayenus</i>	64,08	0,98	32,0	3,23	Kittiphattanabawon <i>et al.</i> , 2005
Perca do Nilo (<i>Lates niloticus</i>)	68,4–72,7	5,0–6,8	20,3–21,6	3,7-6,0	Muyonga <i>et al.</i> , 2004
Catla (<i>Catla catla</i>)	69,15–72,40	2,11–2,60	24,35–26,20	0,66-1,48	Mahboob, 2015
Mrigal (<i>Cirrhinus mrigala</i>)	70,37–73,44	2,03–2,70	22,09–22,90	1,35-2,13	Mahboob, 2015

3.2. Rendimento da extração do colagénio da pele de PEP

Na tabela 6, podemos observar os rendimentos obtidos nos dois ensaios de extração realizados e após o produto liofilizado.

Tabela 6 - Rendimento dos respetivos ensaios realizados.

Amostra	Rendimento (%)	Amostra	Rendimento (%)
ASC 1.1	4,16 (16,06)	ASC 2.1	5,54 (21,39)
ASC 1.2	7,91 (30,54)	ASC 2.2	5,67 (21,89)
PSC 1.1	0,67 ⁽¹⁾ (2,59)	PSC 2.1	0,73 ⁽¹⁾ (2,82)
PSC 1.2	0,92 ⁽²⁾ (3,55)	PSC 2.2	0,57 ⁽¹⁾ (2,20)

(1) Extração com pepsina durante 24 h; (2) Extração com pepsina durante 48 h.

Entre parêntesis são indicados os valores em base seca.

No primeiro ensaio, obteve-se um rendimento muito superior na amostra ASC 1.2 que pode dever-se a diferenças nos vários passos da extração. De facto, durante o processo de extração de colagénio os tempos em que decorreram estas etapas não foram exatamente os mesmos, em particular no da precipitação do colagénio do ASC 1.2 que foi realizada cerca de 18 h após a obtenção do sobrenadante. Estes resultados levaram à realização de um segundo ensaio em que estes tempos de solubilização e precipitação fossem controlados nas duas réplicas de modo a serem o mais próximo possível. Assim, nas duas réplicas do segundo ensaio, atingiram-se rendimentos muito próximos e intermédios dos obtidos no primeiro ensaio.

Os baixos rendimentos obtidos nas extrações com a pepsina devem-se, por um lado, ao facto de se utilizar um material que já sofreu uma prévia extração do colagénio com ácido acético e, por outro, indicia que o colagénio não apresenta muitas ligações com outro material proteico. Apesar de o rendimento atingido na preparação do produto PSC 1.2 ter sido relativamente mais alto, considerou-se reduzir o tempo de extração para apenas 24 h, uma vez que não se justificava a diferença. No outro ensaio, verificou-se assim que os rendimentos atingidos foram da mesma ordem de grandeza.

Na tabela 7 apresentam-se os rendimentos obtidos na extração do colagénio da pele de diferentes espécies, apresentando o ASC uma gama de variação entre 17,7 e 51,4 % que resultam das diferenças entre as espécies e o método de extração. O valor atingido na extração do colagénio da pele de PEP situa-se nesta gama de valores. No que se refere ao PSC os valores apresentados na tabela dizem respeito ao rendimento global obtido na extração com ácido acético e pepsina. Nesta medida se considerarmos apenas o rendimento obtido na extração com a utilização de pepsina, os rendimentos situam-se entre 5,1 e 12,6 %. Neste estudo, o máximo atingido (3,55 %) foi relativamente mais baixo, o que pode dever-se à espécie ou a um tratamento demasiado prolongado da hidrólise.

Tabela 7 – Rendimentos obtidos para o produto ASC e PSC para as peles de diferentes espécies.

Espécie	Rendimento (%)		Referência
	ASC	PSC	
<i>Ictalurus punctatus</i>	25,8	38,4	Liu <i>et al.</i> , 2007
<i>Priacanthus tayenus</i>	30,4	-	Kittiphattanabawon <i>et al.</i> , 2005
Robalo japonês (<i>Lateolabrax japonicus</i>)	51,4	-	Nagai e Suzuki, 2000
Cavala (<i>Scomber japonicus</i>)	49,8	-	Nagai e Suzuki, 2000
<i>Heterodontus japonicus</i>	50,1	-	Nagai e Suzuki, 2000
Catla (<i>Catla catla</i>)	21	26,1	Mahboob, 2015
Mrigal (<i>Cirrhinus mrigala</i>)	17,7	24,5	Mahboob, 2015

3.3. Teor proteico do colagénio

Na tabela 8 encontram-se os valores obtidos para o teor de proteína das amostras de colagénio, ASC e PSC.

Tabela 8 - Teor proteico das diferentes amostras de colagénio.

Amostra	Proteína (%)
ASC 1.1	74,6 ± 1,36 ^c
ASC 1.2	76,6 ± 0,70 ^c
PSC 1.1	60,8 ± 1,23 ^a
PSC 1.2	70,1 ± 0,46 ^b
ASC 2.1	74,9 ± 0,80 ^c
ASC 2.2	75,6 ± 1,33 ^c
PSC 2.1	71,0 ± 0,04 ^b
PSC 2.2	68,0 ± 0,36 ^b

Nota: valores médios da mesma coluna com letras diferentes são significativamente diferentes ($p < 0,05$).

De um modo geral, verifica-se que o teor de proteína das amostras de colagénio ASC é superior ao das amostras PSC o que pode ser devido à maior higroscopicidade destas últimas amostras o que, aliás, se verificou durante as pesagens. Efetivamente, os produtos proteicos que sofreram hidrólise enzimática são frequentemente muito higroscópicos. Por outro lado, as diferentes amostras de colagénio de PEP apresentavam teores proteicos mais baixos do que os obtidos por solubilização com ácido acético a partir da pele de *Priacanthus tayenus* (Kittiphattanabawon *et al.*, 2005) e de tubarão (Kittiphattanabawon *et al.*, 2010), os quais eram respetivamente 94 % e 89,9 %.

3.4. Perfil de aminoácidos

A composição de aminoácidos nas amostras ASC, PSC e peles de PEP encontra-se na tabela 9. Em geral, em todas as amostras apresentam glicina, prolina e hidroxiprolina, os três aminoácidos que constituem os tripéptidos (Gly-X-Y) que se repetem nas cadeias de colagénio, em que X e Y são frequentemente prolina e hidroxiprolina. Para além da glicina que apresenta o teor mais elevado (36,7 % em ASC, 38,2 % em PSC, 28,1 % nas peles de PEP), destaca-se ainda a alanina (13,1 a 14,3 %). Na comparação do perfil de aminoácidos das peles com o das duas amostras de colagénio destaca-se, em particular, a diminuição significativa ($p < 0,05$) dos teores de lisina, tirosina, isoleucina, ácido glutâmico, ácido aspártico, valina, leucina, fenilalanina e histidina como resultado da eliminação de proteínas não-colagenosas presentes na pele.

A tirosina é um aminoácido que se encontra nos telopéptidos e o teor nas amostras de ASC e PSC situam-se na gama de valores referidos por Lin e Liu (2006). O teor de glicina em ambas as amostras de colagénio é semelhante ao obtido no colagénio extraído da pele de luciano (*Nemipterus hexodon*) (Nalinanon *et al.*, 2011) e de truta arco-íris (*Oncorhynchus mykiss*) (Lee *et al.*, 2016), mas cerca do dobro ao referido para o colagénio da pele de catla e mrigal (Mahboob, 2015).

O colagénio das amostras apresentava um teor de prolina semelhante ao colagénio extraído da pele de carpa (*Cyprinus carpio*) (Duan *et al.*, 2009) e da pele de *Scomberomorous niphonius* (Li *et al.*, 2013), porém o valor obtido era muito superior ao do colagénio da pele de tubarão-martelo (*Sphyrna lewini*) (Lin e Liu, 2006). Por outro lado, o teor de hidroxiprolina era relativamente baixo quando comparado com o colagénio das peles de *Scomberomorous niphonius*. O teor de iminoácidos (prolina e hidroxiprolina) era também relativamente baixo quando comparado com os valores referidos Li *et al.* (2013) mas semelhante ao teor obtido por Lin e Liu (2006). Este teor tão baixo pode estar relacionado com o *habitat* do PEP em águas muito profundas, pois que, segundo refere Nalinanon *et al.* (2011) o total de iminoácidos em diferentes espécies está associado ao *habitat* em que

vivem. A hidroxilação da prolina é importante para a estabilidade térmica do colagénio porque a hidroxiprolina é responsável pela estabilidade da tripla hélice (Nalinanon *et al.*, 2011, Lee *et al.*, 2016).

O grau de hidroxilação da prolina nas amostras de colagénio das peles de PEP foi baixo quando comparado com o registado em diferentes espécies nas quais se situa entre 36,2 e 68,9 %, respetivamente para a truta arco-íris de água doce (Lee *et al.*, 2016) e para o tubarão-martelo (Lin e Liu, 2006). O baixo grau de hidroxilação reflete o baixo teor de hidroxiprolina do colagénio do PEP.

Tabela 9 – Composição de aminoácidos, total de iminoácidos e grau de hidroxilação da prolina (HDP) das amostras ASC, PSC e peles de PEP.

Aminoácidos*	ASC	PSC	Peles de PEP
	(resíduos/1 000 resíduos)		
Asp	60,71 ± 2,00 ^a	62,22 ± 4,63 ^a	75,1 ± 3,46 ^b
Glu	74,7 ± 0,27 ^a	79,3 ± 5,65 ^a	93,2 ± 4,20 ^b
Ser	53,0 ± 1,67 ^a	56,8 ± 4,02 ^a	55,0 ± 3,62 ^a
His	6,3 ± 0,23 ^a	6,7 ± 0,54 ^a	9,4 ± 0,30 ^b
Gly	367,2 ± 13,1 ^b	381,9 ± 26,68 ^b	281,4 ± 11,45 ^a
Thr	34,2 ± 1,07 ^a	42,6 ± 3,78 ^b	45,5 ± 0,46 ^b
Arg	50,22 ± 2,04 ^a	49,9 ± 4,00 ^a	52,4 ± 3,77 ^a
Ala	142,6 ± 5,73 ^a	139,7 ± 10,07 ^a	131,1 ± 10,17 ^a
Tyr	3,3 ± 0,06 ^a	3,5 ± 0,27 ^a	9,1 ± 0,31 ^b
Val	16,2 ± 0,59 ^a	16,2 ± 1,29 ^a	29,4 ± 1,24 ^b
Met	10,5 ± 0,66 ^b	2,9 ± 0,51 ^a	10,6 ± 2,27 ^b
Phe	14,9 ± 0,56 ^a	15,6 ± 1,24 ^a	19,5 ± 0,89 ^b
Ile	8,5 ± 0,31 ^a	9,3 ± 0,81 ^a	19,0 ± 0,65 ^b
Leu	23,4 ± 0,85 ^a	25,1 ± 1,85 ^a	36,8 ± 1,07 ^b
Lys	19,9 ± 1,00 ^a	19,5 ± 0,74 ^a	32,2 ± 2,34 ^b
Hyp	35,7 ± 2,53 ^a	40,3 ± 5,59 ^a	44,2 ± 6,31 ^a
Pro	114,7 ± 4,35 ^b	114,4 ± 9,46 ^b	89,9 ± 6,35 ^a
Total de iminoácidos	150,4	154,7	134,1
HDP (%)**	23,7	26,1	33,0

* Os aminoácidos Asn, Gln, Tau, Cys e Trp apresentavam teores inferiores ao limite de quantificação.

** HDP (%) = (Hidroxiprolina / (Prolina + Hidroxiprolina)) * 100

Nota: valores médios da mesma coluna com letras diferentes são significativamente diferentes (p<0,05).

3.5. Perfil electroforético (SDS-PAGE) das amostras de colagénio

Na figura 12, podemos observar o perfil das proteínas das amostras ASC e PSC.

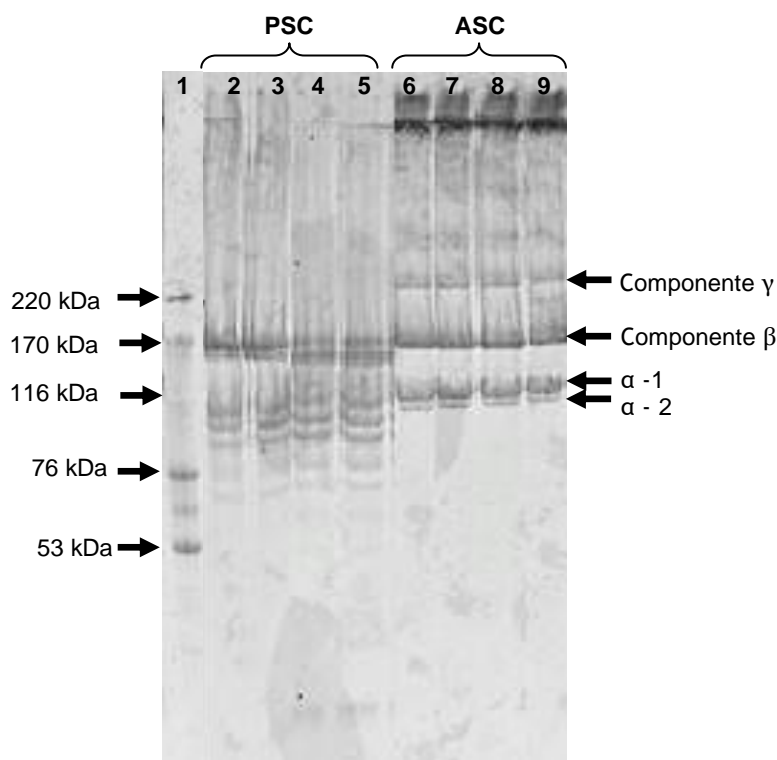


Figura 12 – Perfil electroforético das amostras de colagénio ASC e PSC. 1 - Padrão, 2 - PSC 1.1; 3 - PSC 1.2; 4 – PSC 2.1; 5 – PC 2.2; 6 – ASC 1.1; 7 – ASC 1.2; 8- ASC 2.1; 9- ASC 2.2.

Os respetivos perfis proteicos das amostras de ASC eram muito semelhantes nos dois ensaios e o mesmo acontecia com o PSC. Os resultados obtidos permitem identificar nas amostras ASC as bandas correspondentes às cadeias α -1 e α -2 do colagénio, com massas moleculares correspondentes a cerca de 130 kDa e 120 kDa, respetivamente. No entanto, de acordo com Jongjareonrak *et al.* (2005) a banda identificada como sendo α -1 pode resultar da presença conjunta das cadeias α -1 e α -3. Identificam-se também nestas amostras bandas com massas moleculares próximos de 180 kDa e acima de 220 kDa que, presumivelmente, correspondem às componentes β e γ do colagénio. Estas bandas resultam das ligações cruzadas do colagénio (Muralidharan *et al.*, 2013). Para além destas bandas são também visíveis outras bandas com massas moleculares muito elevadas que podem resultar da presença de agregados.

No perfil das amostras de PSC estão também presentes as bandas das cadeias α -1 e α -2, embora a da α -1 esteja mais ténue enquanto a α -2 se apresentou reforçada. Por outro lado, a banda correspondente à componente γ desapareceu enquanto a da componente β

tornou-se menos intensa. A perda da intensidade da banda α -1 sugere uma parcial hidrólise desta cadeia enquanto que a intensificação α -2 pode dever-se à hidrólise das componentes β e γ . Esta intensificação da banda da α -2 foi também verificada por Jongjareonrak *et al.* (2005) e Huang *et al.* (2011), mas não observaram qualquer diminuição da intensidade da banda α -1. Além disso, as bandas com elevada massa molecular observadas no perfil das amostras ASC praticamente desapareceram do perfil das amostras PSC, mas nestas amostras identificam-se múltiplas bandas abaixo de 116 kDa evidenciando a hidrólise promovida pela pepsina.

O perfil proteico do colagénio obtido é semelhante ao referido por outros autores que utilizaram peles de peixe de diferentes espécies para a extração do colagénio (Muyonga *et al.*, 2004; Zhang *et al.*, 2009; Muralidharan *et al.*, 2013). De acordo com Muralidharan *et al.* (2013), este perfil proteico do colagénio leva admitir que se trata de colagénio tipo I.

3.6. Solubilidade

3.6.1. Efeito do pH na solubilidade

O efeito do pH na solubilidade do colagénio ASC encontra-se representado na figura 13. A solubilidade do colagénio é máxima entre pH 2 e 6 e a partir de pH 8, a solubilidade diminui atingindo 66,3 % mantendo-se praticamente constante até pH 10. A solubilidade desta amostra de colagénio para pH alcalinos era relativamente elevada quando comparada com os valores referidos por Jongjareonrak *et al.* (2005), que obtiveram percentagens de solubilização de 0 a 10 % entre pH 7 e 10. No entanto, Singh *et al.* (2011) referem percentagens de solubilização de 15 a 20 % e Heu *et al.* (2010) de 30 a 40 % nesta gama de pH. Neste trabalho, não se registou um mínimo na solubilidade como seria expectável na gama de pH de 6 a 9, onde ocorre o ponto isoelétrico do colagénio (Foegeding *et al.*, 1996). Jongjareonrak *et al.* (2005) e Heu *et al.* (2010) observaram um mínimo de solubilidade a pH 7 do colagénio da pele de luciano (*Lutjanus vitta*) e de *Pangasianodon hypophthalmus*, respetivamente. Por sua vez, Singh *et al.* (2011) não registaram a ocorrência de um mínimo de solubilidade evidente.

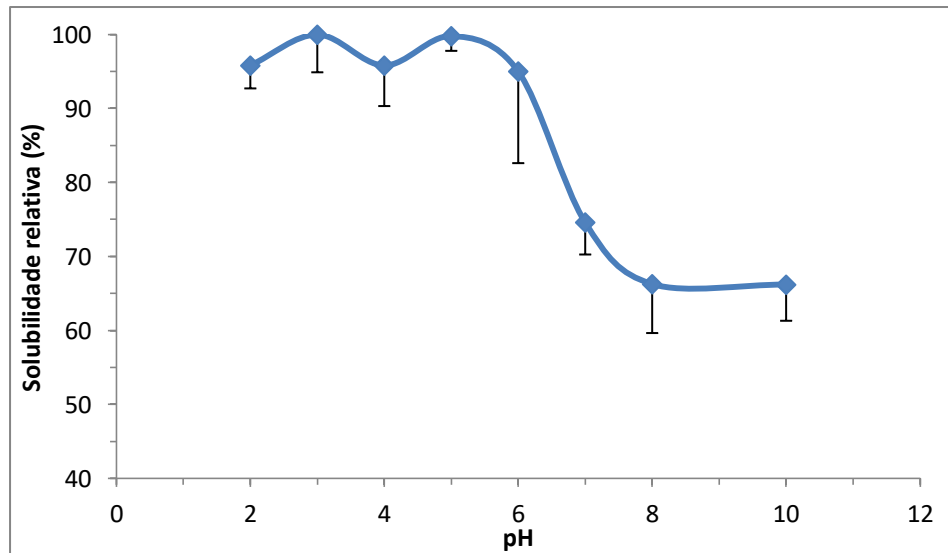


Figura 13 - Solubilidade do colagénio ASC das peles de PEP em ácido acético 0,5 M a diferentes pH.

3.6.2. Efeito da concentração de sal (NaCl) na solubilidade

Na figura 14 apresenta-se o efeito das diferentes concentrações de sal (NaCl) na solubilidade do colagénio ASC. Como se pode observar, a solubilidade diminui com o aumento da concentração até 17,5 % de NaCl, atingindo cerca de 39 %. Este decréscimo da solubilidade com a concentração de NaCl resulta do fenómeno de *salting-out*. Para concentrações crescentes de sal ocorre uma maior interação dos iões Na^+ e Cl^- com a água levando a um aumento da interações hidrófobas entre as proteínas e conseqüente precipitação (Jongjareonrak *et al.*, 2005). Esta diminuição da solubilidade com a concentração de sal verificou-se de uma maneira gradual, ao passo que no trabalho de Jongjareonrak *et al.* (2005) se verificou uma diminuição abrupta, passando de quase 100 % de solubilidade para 35 % quando a concentração de sal variava de 2 para 3 %, muito inferior à concentração para a qual se registou o mínimo de solubilidade neste trabalho. De igual modo, Singh *et al.* (2011) observaram também o mesmo comportamento em que a solubilidade passou de 100 % para 30 % respetivamente para as concentrações de 2 e 4 %.

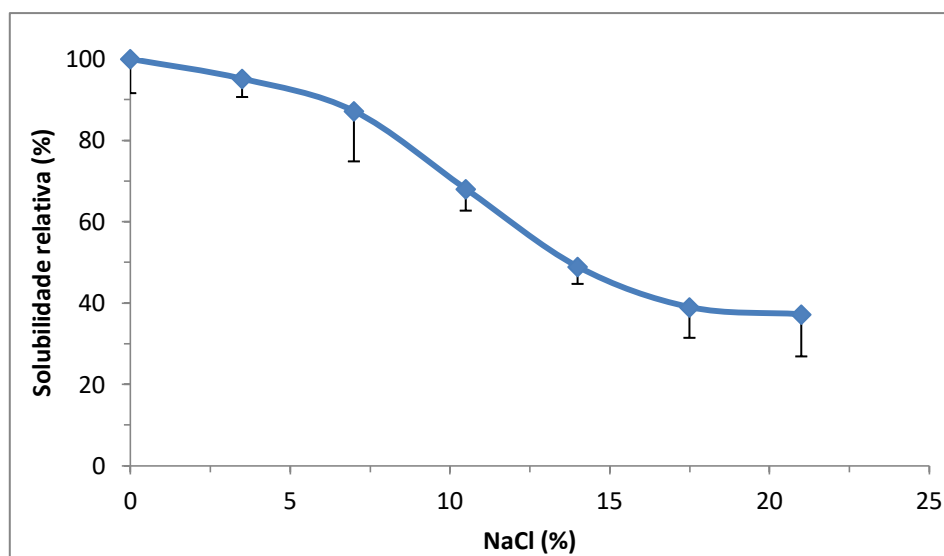


Figura 14 – Solubilidade do colagénio ASC em ácido acético 0,5 M a diferentes concentrações de NaCl (%).

3.7. Espectro UV-visível das amostras ASC

O espectro UV-visível de uma solução da amostra ASC 1.1 encontra-se representado na figura 15, o qual apresenta um máximo de absorvância muito bem definido a 227 nm, que é característico do colagénio. Lin e Liu (2006) observaram que o colagénio extraído da pele de tubarão-martelo apresentava um máximo a 218 nm, situando-se o pico entre 190 e 240 nm. Por sua vez, Liu *et al.* (2007) referem um máximo a 232 nm para o colagénio da pele de peixe-gato e Zhang *et al.* (2009) um máximo a 233 nm para bagre (*Mystus macropterus*).

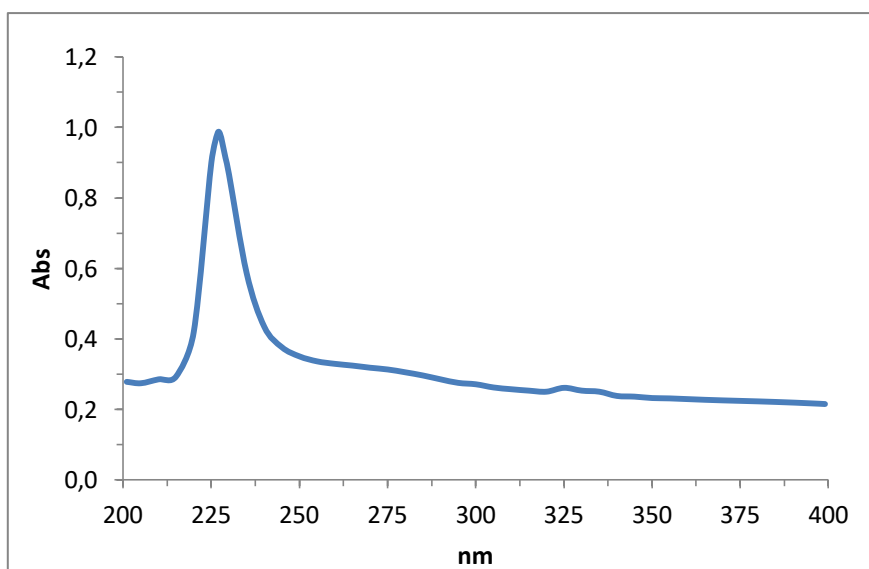


Figura 15 – Espectro UV-visível de uma solução da amostra ASC 1.1 resultante da extração das peles de PEP.

Na figura 16 apresenta-se o espectro da amostra ASC 1.2, cujo máximo de absorvância se situa a 235 nm. Além disso, o pico não era tão bem definido como no caso da amostra ASC 1.1. Este facto levou a que a solução fosse centrifugada, obtendo-se um segundo espectro que continuava a apresentar uma absorvância relativamente elevada a partir de cerca de 250 nm. Este resultado indicia a presença de outras proteínas não-colagenosas com fenilalanina e tirosina cujos máximos de absorção se verificam a 251 nm e 283 nm, respetivamente.

O espectro UV-visível pode ser usado no controlo da qualidade do colagénio dado que, segundo Jose e Harrington (1964) e Na (1988), permite medir o teor de tirosina e a integridade dos telopéptidos. Deste modo, este resultado leva a concluir que este colagénio apresentava uma menor pureza do que o colagénio ASC 1.1. As amostras ASC 2.1 e 2.2 apresentavam espectros semelhantes. Atendendo aos teores de tirosina e de fenilalanina das amostras ASC do segundo ensaio, muito semelhantes aos referidos a outros autores (Zhang *et al.*, 2009; Nalinanon *et al.*, 2011), e ao espectro no UV-visível do colagénio ASC 1.2 após centrifugação (fig. 16, II), é de admitir que o colagénio extraído da pele de PEP apresentava um bom grau de pureza.

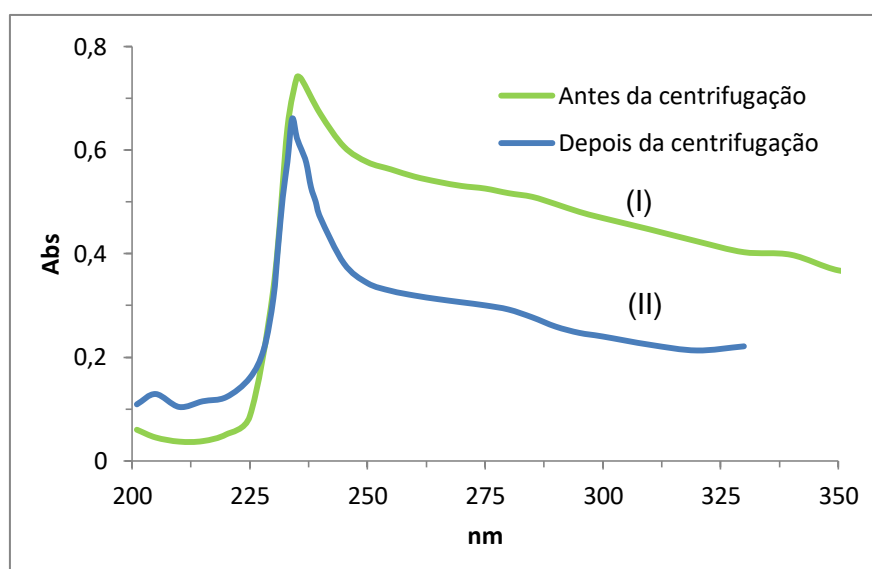


Figura 16 – Espectro UV-visível de uma solução da amostra ASC 1.2 resultante da extração das peles de PEP, antes e depois da centrifugação.

3.8. Parâmetros da cor das amostras do colagénio

Os valores dos parâmetros da cor, L^* , a^* , b^* e da brancura (W) das amostras ASC e PSC dos diferentes ensaios encontram-se na tabela 10.

Tabela 10 – Parâmetros da cor das amostras de colagénio ASC e PSC (L^* , a^* e b^*).

Amostra	L^*	a^*	b^*	W
ASC 1.1	$85,69 \pm 0,28^f$	$1,53 \pm 0,07^a$	$4,07 \pm 0,21^a$	$85,04 \pm 0,27^f$
ASC 1.2	$84,02 \pm 0,42^e$	$1,60 \pm 0,08^a$	$4,60 \pm 0,08^{bc}$	$83,29 \pm 0,41^e$
PSC 1.1	$49,10 \pm 0,03^a$	$3,69 \pm 0,04^e$	$4,63 \pm 0,04^{bc}$	$48,76 \pm 0,03^a$
PSC 1.2	$52,00 \pm 0,01^b$	$3,84 \pm 0,01^f$	$5,91 \pm 0,01^d$	$51,49 \pm 0,01^b$
ASC 2.1	$75,92 \pm 0,10^d$	$2,71 \pm 0,04^c$	$4,48 \pm 0,02^b$	$75,36 \pm 0,10^d$
ASC 2.2	$75,59 \pm 0,28^d$	$2,40 \pm 0,02^b$	$4,71 \pm 0,06^c$	$75,02 \pm 0,27^d$
PSC 2.1	$59,09 \pm 0,02^c$	$3,30 \pm 0,03^d$	$6,58 \pm 0,01^e$	$58,44 \pm 0,02^c$
PSC 2.2	$52,29 \pm 0,04^b$	$3,96 \pm 0,03^f$	$4,58 \pm 0,01^{bc}$	$51,91 \pm 0,04^b$

Nota: valores médios da mesma coluna com letras diferentes são significativamente diferentes ($p < 0,05$).

De um modo geral, as amostras ASC eram significativamente ($p < 0,05$) mais claras do que as PSC que apresentavam uma tonalidade acinzentada (Fig. 17) devido à presença

dos pigmentos da pele que coprecipitavam com o colagénio. Além disso, registaram-se diferenças entre os ensaios, como por exemplo entre a brancura das amostras ASC do primeiro ensaio (ca. 85) e do segundo (ca. 76), em resultado das diferentes percentagens de pigmentos nas amostras. Estas diferenças resultam das condições de centrifugação da suspensão obtida após solubilização com ácido acético que não permitiam a eliminação de alguns pequenos fragmentos da pele preta que persistiam no sobrenadante e coprecipitavam com o NaCl. Esta fragmentação da pele preta é mais acentuada na preparação de PSC levando à obtenção de produtos mais escuros.

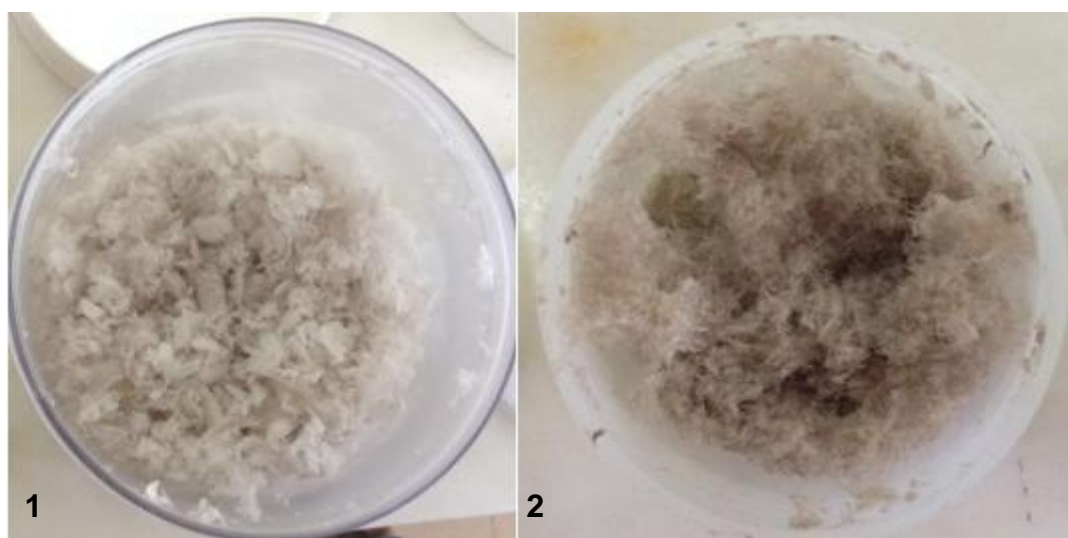


Figura 17 – Produto final obtido da extração, após ser liofilizado. 1 – ASC, 2 – PSC.

3.9. Propriedades reológicas

Para avaliar o comportamento reológico das soluções de colagénio a pH 2 e 7 em função da temperatura, calculou-se o valor da $\text{tg } \delta$ (G''/G') cuja variação com a temperatura se apresenta na figura 18. Conforme se pode verificar o máximo da $\text{tg } \delta$ registou-se, aparentemente, a 35,8 °C e 37,6 °C a pH 2 e pH 7, respetivamente. A temperatura à qual ocorre este máximo tem sido considerada a de desnaturação dinâmica (T_{dd}) avaliada a partir das medições reológicas dinâmicas (Zhang *et al.* 2010; Ding *et al.*, 2014). O rápido aumento do valor da $\text{tg } \delta$ reflete o colapso da tripla hélice num enrolamento aleatório, isto é, a rutura das ligações de hidrogénio que estabilizam a estrutura secundária do colagénio (Zhang *et al.* 2010). Estes autores referem uma T_{dd} de 29,5 °C para o colagénio extraído da pele de bagre e Ding *et al.* (2014) uma temperatura de 39,3 °C para o colagénio da pele de vitela. Esta diferença tem sido atribuída à menor percentagem de hidroxiprolina no colagénio do peixe em comparação com o colagénio de bovinos, dado que admite-se que a estabilidade da

tripla hélice depende das ligações de hidrogénio estabelecidas com a hidroxiprolina (Jenkins e Raines, 2002).

É de admitir que os valores da T_{dd} obtidos para o colagénio de PEP estejam sobrestimados, dado que na gama de temperaturas entre 20 e 40 °C houve apenas duas leituras dos parâmetros G' e G'' , isto é, a pH 2 um valor foi registado a 23,5 e outro a 35,8 °C e a pH 7 a 25,2 e 37,6 °C. Por consequência, não é possível definir com rigor o máximo da $\text{tg } \delta$ e, portanto, de T_{dd} .

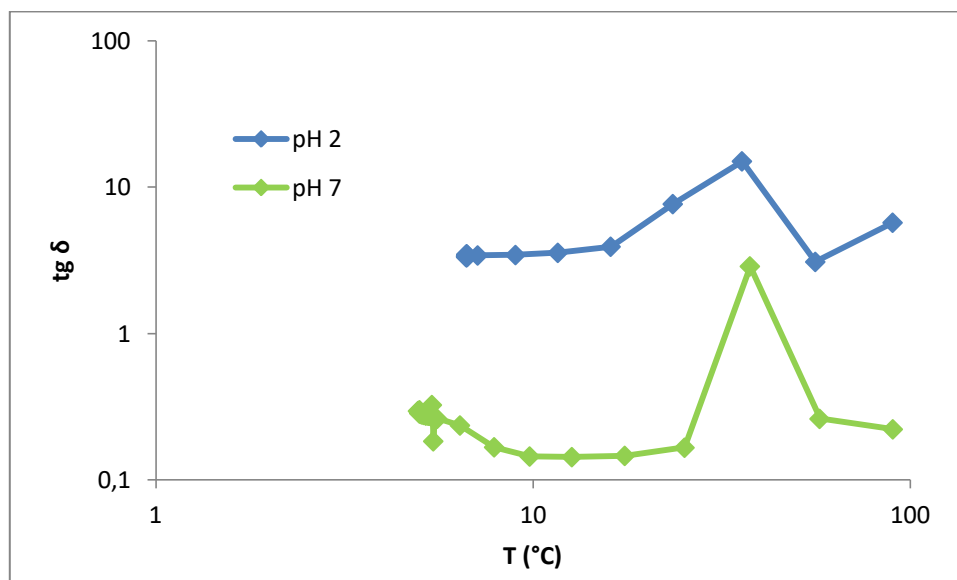


Figura 18 – Evolução da tangente δ das soluções de colagénio em função da temperatura de 5 a 90 °C.

Após o ciclo térmico aquecimento/arrefecimento procedeu-se à maturação dos géis das soluções de colagénio preparadas a pH 2 e 7, cujas cinéticas estão representadas na figura 19. As duas cinéticas foram muito diferentes, verificando-se que a pH 2 os valores das componentes G' e G'' permaneceram constantes, em que G'' era sempre superior a G' durante o período de maturação. Quanto à cinética de maturação a pH 7, verificou-se que neste caso G' era sempre superior a G'' o qual aumentava progressivamente até ao final do processo de maturação. Montero e Borderías (1990) verificaram que a força do gel obtido a partir de soluções de colagénio extraído da pele de pescada (*Merluccius merluccius* L.) e de truta (*Salmo irideus* Gibb) aumentava com o pH na gama de 1 a 7.

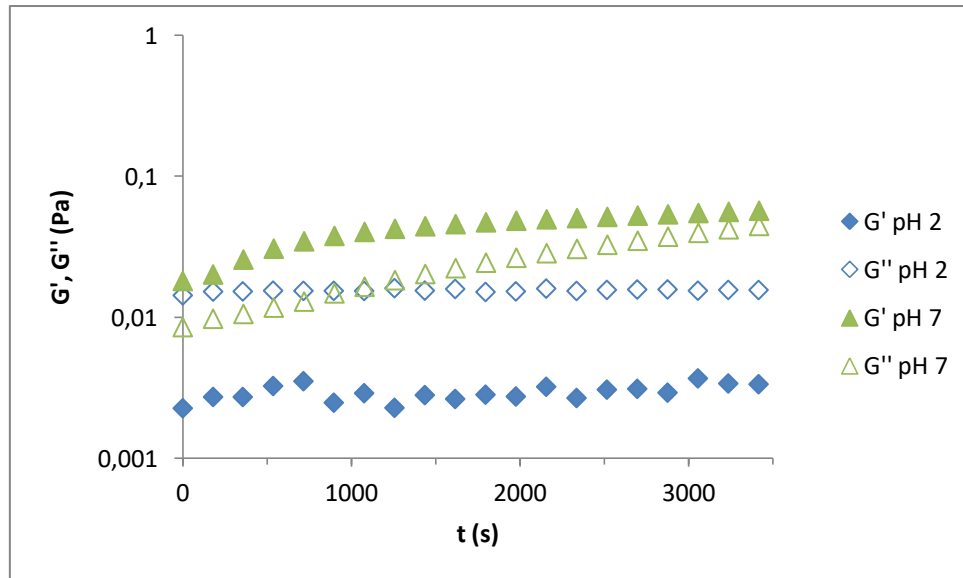


Figura 19 – Cinéticas de maturação a 5 °C, durante 1 h, das amostras de colagénio a pH 2 e 7.

O espectro mecânico das soluções de colagénio estudadas encontra-se na figura 20. Em ambos os casos, verificava-se uma forte dependência de G' e G'' com o aumento da frequência, havendo uma tendência para o cruzamento destas duas componentes viscoelásticas a frequências mais elevadas. No caso do sistema a pH 2, este cruzamento ocorreu a cerca de 32 Hz e a 2 Hz no sistema a pH 7, sugerindo um aumento da estruturação com a frequência, embora fosse muito fraca.

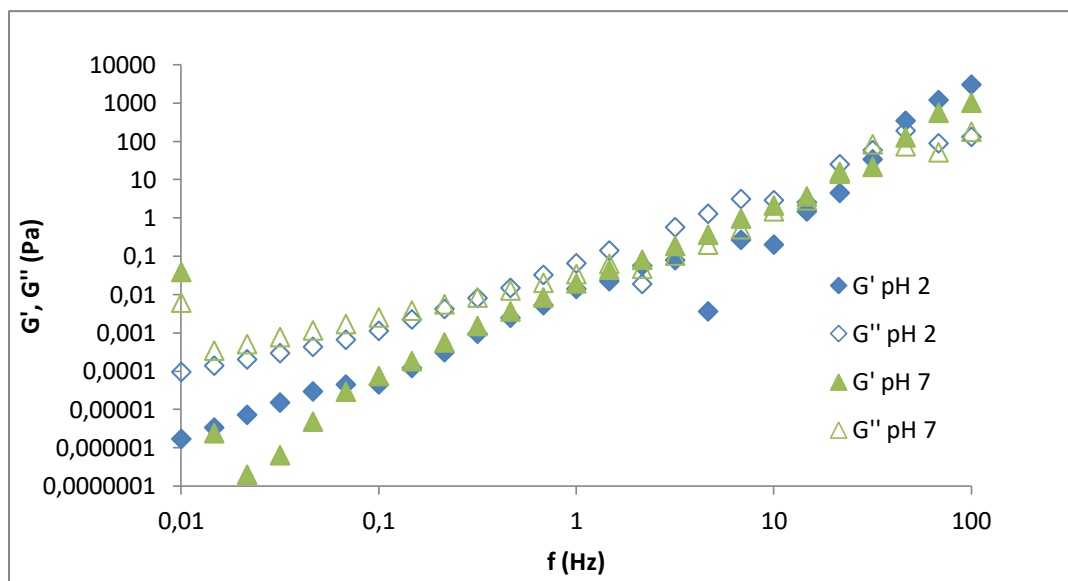


Figura 20 – Espectro mecânico a 5 °C das amostras de colagénio a pH 2 e 7.

Na figura 21, encontra-se a viscosidade em função da taxa de deformação das soluções de colagénio a pH 2 e 7. Em ambas as soluções de colagénio, a viscosidade diminui com o aumento da taxa de deformação a partir de $0,005 \text{ s}^{-1}$, sendo a viscosidade a pH 2 mais baixa que a pH 7. Este comportamento é típico de fluidos reofluidificantes e tem sido já referido este tipo de comportamento para colagénio extraído da pele de bagre (Zhang *et al.*, 2010). Também as soluções de colagénio da pele de vitela exibem o mesmo comportamento (Ding *et al.*, 2014; Tian *et al.*, 2016).

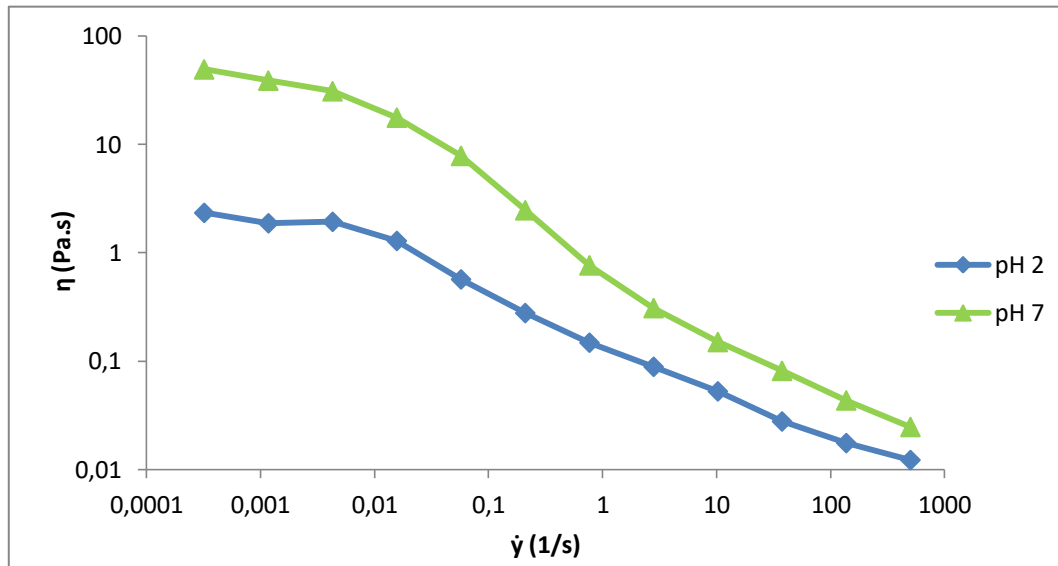


Figura 21 – Viscosidade em função da taxa de deformação das soluções de colagénio a pH 2 e 7.

Na gama de taxas de deformação em que as soluções de colagénio se comportam como um fluido reofluidificante, ajustou-se o modelo de Ostwald-de Waele ou Lei da Potência (Fig. 22). Em ambos os casos, obtém-se um valor de n inferior a 1 confirmando que se tratam de fluidos com comportamento reofluidificante. De acordo com os parâmetros obtidos com este modelo verificamos que a solução de colagénio a pH 7 é mais consistente ($k = 0,9115 \text{ Pa.s}^n$) e tem um menor índice de escoamento ($n = 0,647$) do que a solução a pH 2 ($k = 0,1573 \text{ Pa.s}^n$ e $n = 0,45$).

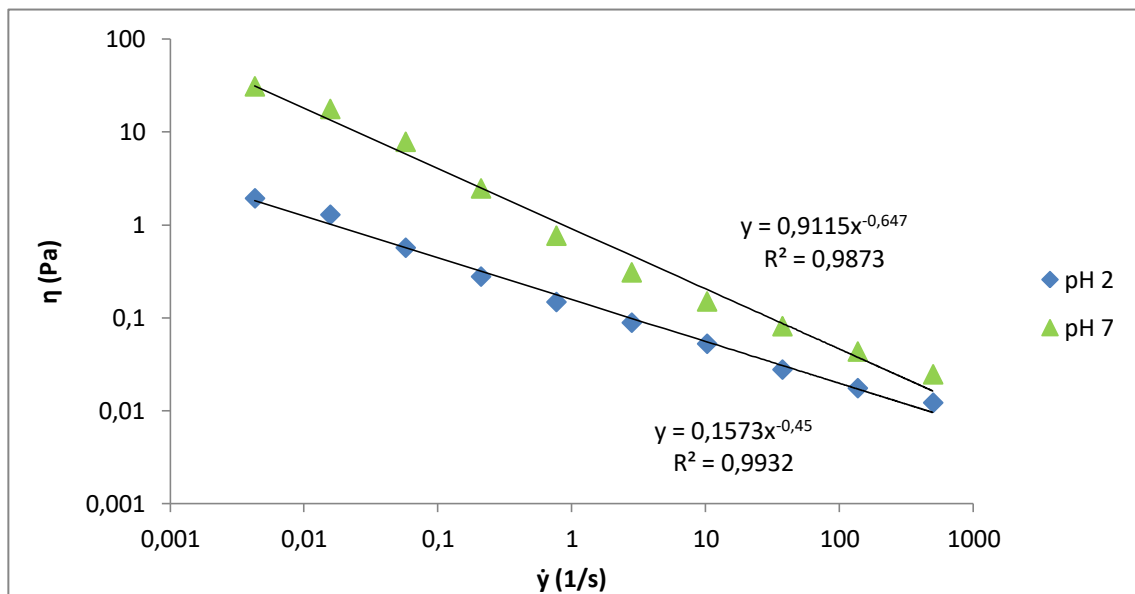


Figura 22 - Viscosidade das soluções de colagénio a pH 2 e 7 em função da taxa de deformação, com o ajuste do modelo Ostwald-de Waele.

A viscosidade das soluções de colagénio a pH 2 e 7 em função da temperatura encontra-se representada na figura 23. O comportamento até cerca de 30 °C é semelhante e relativamente constante em ambos os valores de pH, sendo a viscosidade a pH 7 mais elevada. Após esta temperatura na solução a pH 2 observa-se uma diminuição acentuada da viscosidade voltando a atingir um novo patamar a partir de aproximadamente 40 °C. Esta evolução da viscosidade em função da temperatura é semelhante à registada em soluções a pH 2 de colagénio da pele de peixe (Zhang *et al.*, 2010; Safandowska e Pietrucha, 2013) e de bovino (Lai *et al.*, 2008; Ding *et al.*, 2014; Tian *et al.*, 2016). A partir da evolução da viscosidade em função da temperatura da solução a pH 2, obteve-se o valor de 32,5 °C para a temperatura de desnaturação do colagénio que corresponde à temperatura em que a viscosidade atingiu 50 % do valor inicial (Lai *et al.*, 2008).

A viscosidade da solução de colagénio a pH 7 apresentou um comportamento irregular não permitindo obter o valor da temperatura de desnaturação.

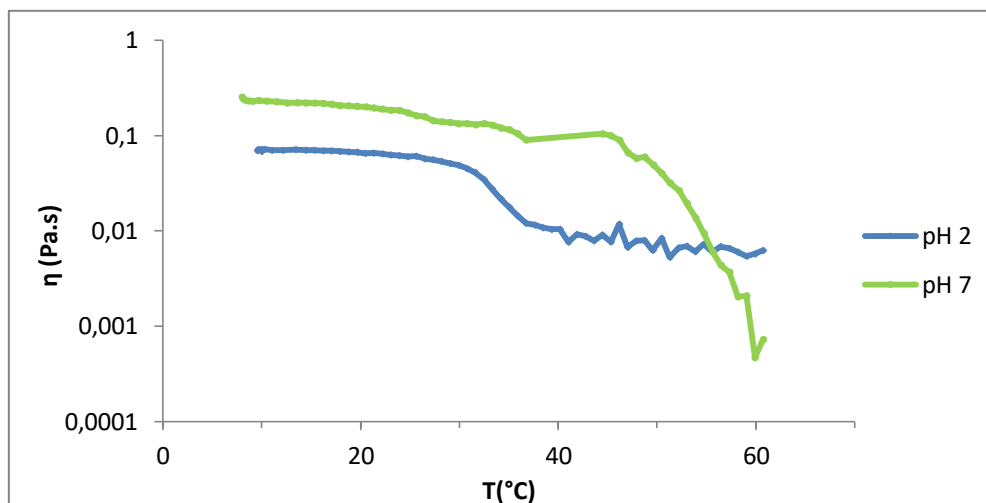


Figura 23 - Viscosidade das soluções de colagénio a pH 2 e 7 em função da temperatura das peles de PEP.

3.10. Hidrolisados enzimáticos de colagénio

No estudo da hidrólise enzimática de colagénio assistida por micro-ondas, realizaram-se ensaios preliminares com pepsina, protamex e tripsina a fim de testar a enzima que permitia atingir uma hidrólise mais acentuada. Nesse sentido, determinou-se o perfil peptídico dos hidrolisados obtidos com cada uma das enzimas, apresentando-se nas figuras 24, 25 e 26 os respetivos cromatogramas.

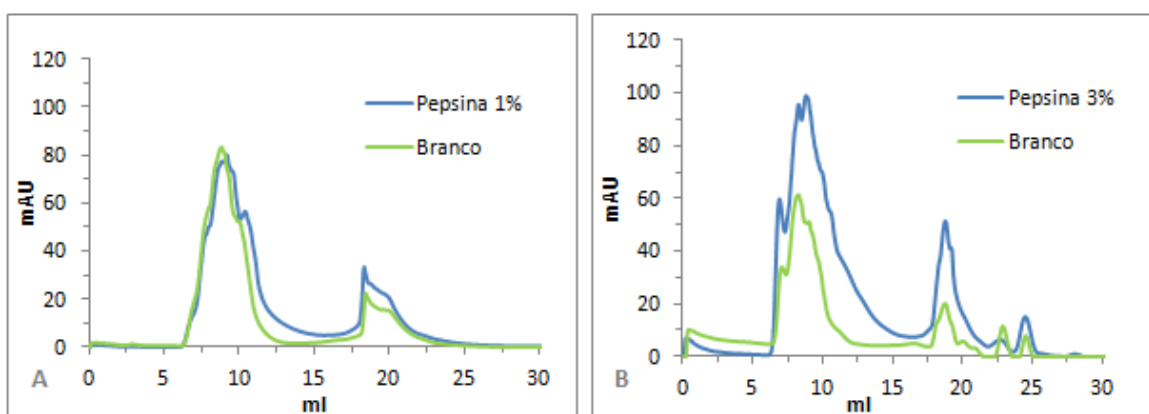


Figura 24 - Perfil dos péptidos obtidos para os hidrolisados de colagénio com 1 % (A) e 3 % (B) de pepsina.

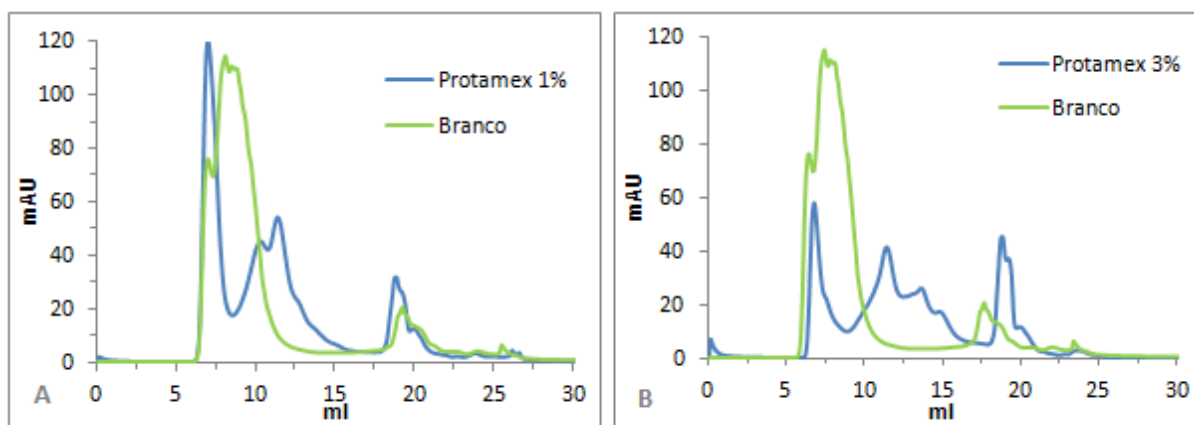


Figura 25 - Perfil dos péptidos obtidos para os hidrolisados de colagénio com 1 % (A) e 3 % (B) de protamex.

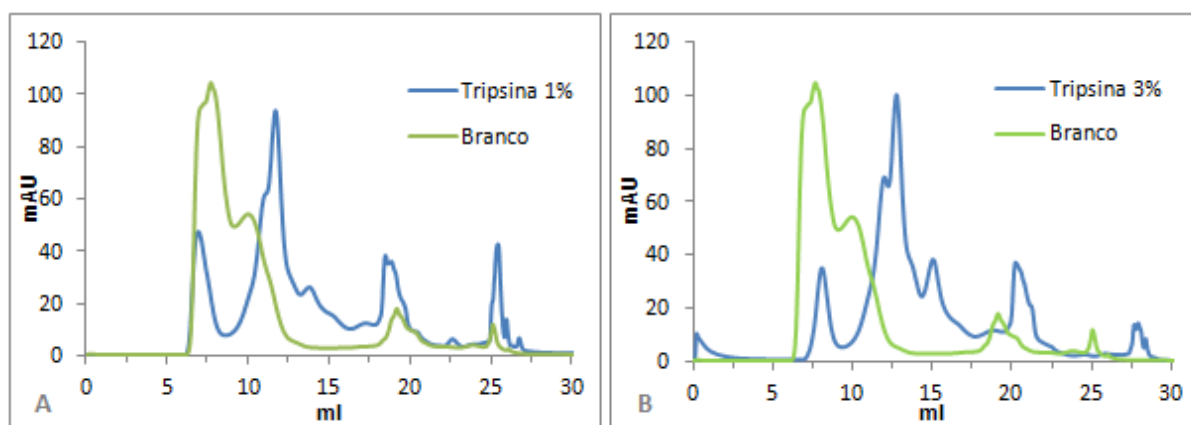


Figura 26 - Perfil dos péptidos obtidos para os hidrolisados de colagénio com 1 % (A) e 3 % (B) de tripsina.

Na hidrólise com pepsina, não parece ter ocorrido hidrólise no ensaio com 1 % e uma hidrólise muito limitada a 3 %. No caso da protamex, os perfis peptídicos obtidos com 1 % e 3 % desta enzima parecem indicar que esta enzima foi efetiva na hidrólise. Também os hidrolisados preparados com tripsina apresentavam perfis peptídicos que evidenciavam a hidrólise do colagénio, mas neste último caso os cromatogramas sugerem uma maior repetibilidade da hidrólise. Estes resultados levaram a selecionar a tripsina com uma concentração de 3 % para realizar um ensaio de preparação de hidrolisados em maior escala de modo a obter maior quantidade de material para posterior caracterização. Na figura 27 apresenta-se o perfil peptídico dos hidrolisados obtidos com a tripsina em maior escala. Este perfil é semelhante ao obtido em pequena escala (Fig. 26), indicado a repetibilidade do processo de hidrólise do colagénio. O primeiro pico, que eluiu com o volume de 7 ml, corresponde a proteínas de elevada massa molecular. Porém, como se pode verificar no perfil das proteínas não hidrolisadas (Fig. 26), há uma grande fração destas proteínas que são hidrolisadas dando origem a péptidos com massas moleculares compreendidas entre 1 700 e 8 800 Da (zona realçada na Fig. 27).

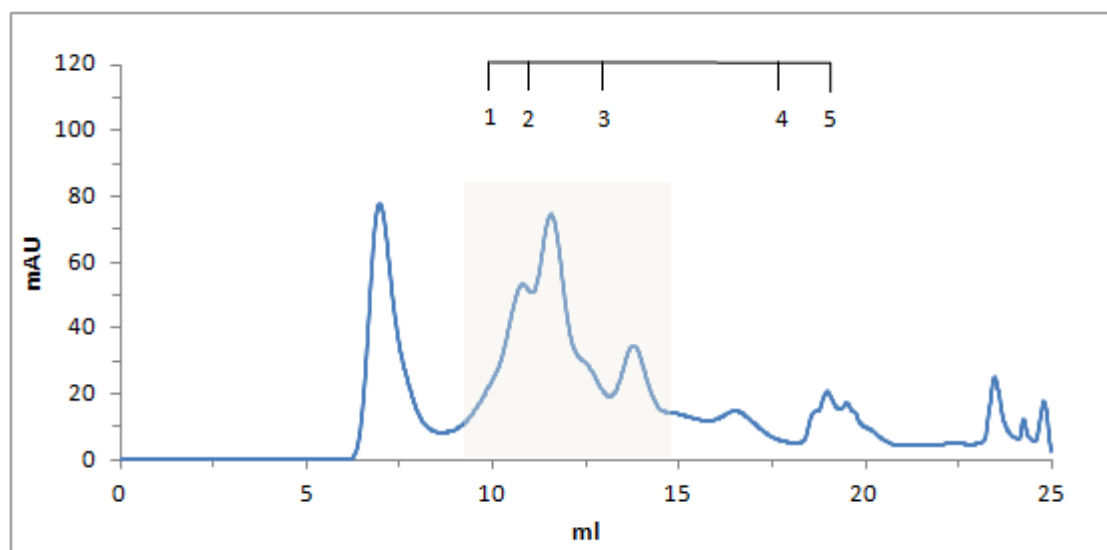


Figura 27 – Perfil de péptidos obtido pela hidrólise do colagénio com tripsina 3 %. 1 – ribonuclease A (13 700 Da), 2 – aprotinina (6 500 Da), 3 – angiotensina I (1 296 Da), 4 – triglicina (189 Da), 5 – glicina (75 Da).

3.10.1. Proteína total do hidrolisado de colagénio

O teor de proteína total do hidrolisado de colagénio preparado com tripsina 3 % foi de $26,0 \pm 0,98$ % e apresentava um teor aproximado de cinza de 30 %. Este valor demasiado elevado deve-se ao facto da hidrólise ter sido realizada na presença de tampão fosfato, de modo a controlar o pH durante o processo.

3.10.2. Grau de hidrólise

O hidrolisado de colagénio obtido apresentava um grau de hidrólise (GH) de $7,25 \pm 0,03$ %. Os hidrolisados de colagénio extraído das escamas de *Pseudosciaena crocea* e preparados com 3 % de tripsina apresentavam um GH de 17,47 %, após 4 h de hidrólise (Wang *et al.*, 2013). Estes autores usaram também pepsina (2,5 %) na hidrólise de colagénio, tendo obtido um GH de 13,73 % após o mesmo tempo de hidrólise. O colagénio extraído da pele de panga (*Pangasius pangasius*) foi também utilizado na preparação de hidrolisados usando papaína (Baehaki *et al.*, 2015) e bromelina (Baehaki *et al.*, 2016a) tendo sido obtidos GH de 4,57 % e 3,58 %, respetivamente, após 160 min. Porém, foi atingido um GH de 51,85 % do colagénio da pele de peixe quando foi hidrolisado com uma collagenase de origem microbiana durante 90 min (Baehaki *et al.*, 2016b). Em todos estes trabalhos foi utilizada uma metodologia de hidrólise com aquecimento térmico.

Estes resultados, embora preliminares, são prometedores dado que se conseguiram atingir GH da mesma ordem de grandeza dos referidos anteriormente, exceto com a collagenase, mas após um tempo de hidrólise muito mais curto (10 min).

3.10.3. Atividade antioxidante

i) Atividade antiradicalar do DPPH

Na determinação da atividade antiradicalar dos hidrolisados de colagénio relativamente ao DPPH ocorria a formação de uma dispersão com turbidez crescente com a concentração de hidrolisado que impedia uma leitura correta da absorvância. Esta dispersão poderá estar relacionada com a presença de muitos sais no hidrolisado que limitava a solubilidade da solução de hidrolisado na solução etanólica de DPPH. Por outro lado, verificou-se que as dispersões formadas com soluções de hidrolisados com concentração a partir de $20 \text{ mg}\cdot\text{ml}^{-1}$ apresentavam uma cor amarelada, indicando que o hidrolisado exibia atividade antiradicalar.

ii) Atividade antiradicalar do ABTS

Na figura 28 mostra o efeito da concentração do hidrolisado de colagénio na inibição dos radicais do ABTS. Como se pode verificar, regista-se um aumento gradual de atividade antiradicalar com a concentração de proteína do hidrolisado. Estes hidrolisados apresentavam uma atividade antiradicalar relativamente baixa e, por outro lado, esta evolução não é típica de um antioxidante primário. Esta baixa atividade pode estar relacionada com o baixo GH dos hidrolisados obtidos. Num estudo sobre a preparação de hidrolisados do colagénio de lula-gigante (*Dosidicus gigas*) com tripsina verificou-se que os hidrolisados obtidos após 30 min e com uma concentração de $2,5 \text{ mg}\cdot\text{ml}^{-1}$, apresentavam uma inibição de cerca de 40 % de ABTS (Suárez-Jiménez *et al.*, 2015).

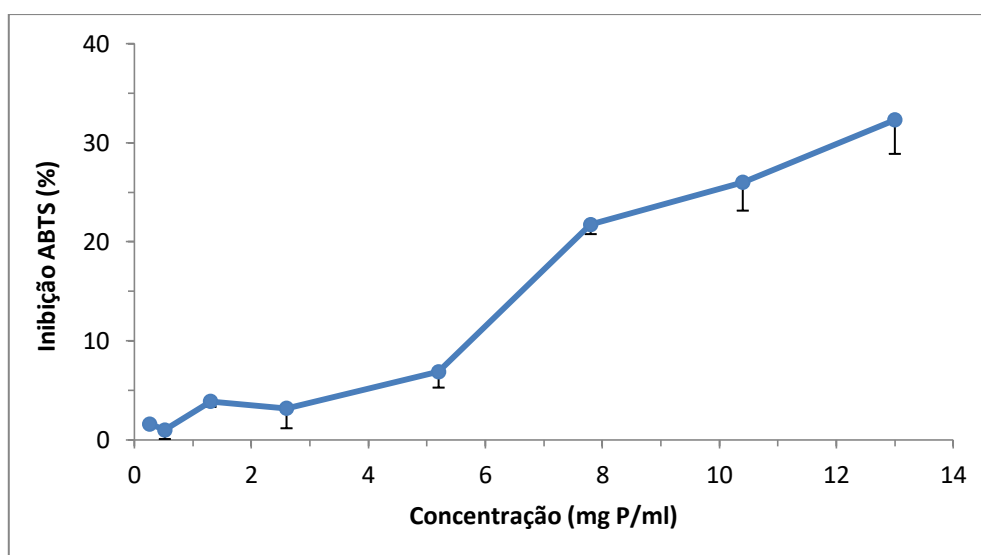


Figura 28 - Inibição dos radicais de ABTS do hidrolisado do colagénio.

iii) Poder redutor

O poder redutor do hidrolisado de colagénio em função da concentração encontra-se na figura 29, verificando-se um aumento regular da absorvância com a concentração. Esta evolução do poder redutor com concentração é usual nos hidrolisados proteicos, mas os obtidos no presente trabalho apresentavam um baixo poder redutor. Tal como no caso da atividade antiradicalar relativamente ao ABTS, também este baixo poder redutor pode ser devido ao GH, tendo sido referido que o poder redutor dos hidrolisados proteicos aumenta com o GH (Bougatef *et al.*, 2010). Zeng *et al.* (2015) obtiveram um valor de absorvância de 0,3 para o poder redutor de uma solução com 16 mg.ml⁻¹ de hidrolisado de colagénio extraído com pepsina das escamas de tilápia.

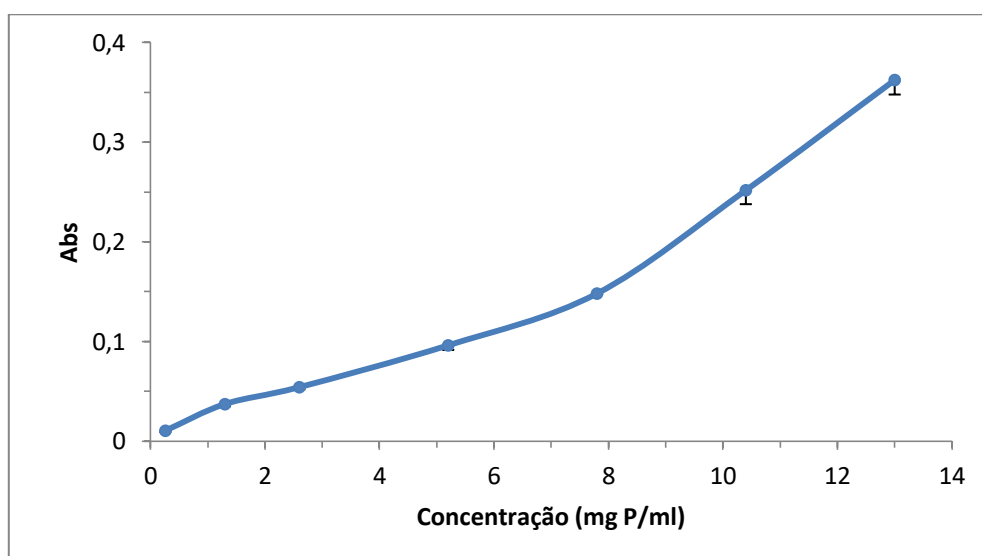


Figura 29 - Poder redutor do hidrolisado de colagénio das peles de PEP.

4. Conclusões e Perspetivas Futuras

Neste trabalho procedeu-se à extração e caracterização de colagénio da pele de PEP e ainda à preparação e avaliação da atividade antioxidante de hidrolisados de colagénio. A pele de PEP apresentava um teor de gordura elevado (21,8 %) e o teor de proteína era relativamente baixo (11,8 %). O rendimento obtido na extração do colagénio com ácido acético (ASC) variou entre 16,06 e 30,54 % e o extraído com pepsina (PSC) entre 2,20 e 3,55 % (em base seca), indicando que o segundo passo de extração com a pepsina não apresenta vantagens tecnológicas. O teor do proteico do ASC era cerca de 75 % e do PSC 68 %. As amostras de colagénio, ASC e PSC, e as peles de PEP apresentaram glicina, prolina e hidroxiprolina, contudo o nível deste último aminoácido era relativamente baixo, refletindo-se no teor de iminoácidos que se situava ente 13,4 – 15,5 %. O grau de hidroxilação da prolina obtido encontrava-se na gama de 23,7 a 33,0 %.

No perfil proteico obtido por eletroforese SDS-PAGE foi possível identificar as bandas características correspondentes às cadeias α -1 e α -2 do colagénio, permitindo concluir que se trata de colagénio do tipo I. A evolução da solubilidade do colagénio com o pH era a típica destas proteínas mas apresentava uma solubilidade de 66 % a valores de pH na zona alcalina. A solubilidade do colagénio diminuía significativamente com o aumento da concentração de sal.

O espectro no UV-visível apresentava um máximo a 227 nm, característico do colagénio. O traçado deste espectro pode constituir um método de controlo do grau de pureza do colagénio obtido. A brancura do ASC (ca. 80) era superior à do PSC (ca. 53), indicando que no processo de extração do colagénio com pepsina ocorreu a coprecipitação dos pigmentos da pele.

A solução de colagénio a pH 7 apresentava as características de um gel embora frágil e pouco estruturado. A pH 2 a solução de colagénio comportava-se como uma dispersão. Ambas as soluções exibiam uma forte dependência da frequência, sugerindo um aumento da estruturação do sistema.

As soluções de colagénio a pH 2 e 7 exibiam o comportamento de um fluido reofluidificante, sendo a solução a pH 7 mais consistente e apresentando um menor índice de escoamento. A temperatura de desnaturação dinâmica calculada do colagénio a pH 2 calculada a partir da viscosidade vs temperatura foi de 32,5 °C.

A hidrólise do colagénio com 3 % de tripsina e aquecimento com micro-ondas permitia obter hidrolisados com um grau de hidrólise de 7 % após 10 min. O hidrolisado apresentava um teor de proteína de 26 % e péptidos com massas moleculares

compreendidas entre 1 700 e 8 800 Da e possuía uma atividade antioxidante relativamente baixa.

Neste trabalho estudou-se pela primeira vez a extração e caracterização do colagénio da pele de peixe-espada-preto, apresentando-se a seguir as condições de extração e as principais características:

	ASC	PSC
Condições de extração	<p>Peles</p> <ul style="list-style-type: none"> • Extração das proteínas não-colagenosas com NaOH (0,1 M, 1:30 peles/volume solução); • Extração da gordura com álcool butílico 10% (1:30 m/v); • Solubilização em ácido acético 0,5 M (1:30 m/v); • Precipitação do colagénio NaCl 2,9 M a pH 7,5; • Diálise; • Liofilização. 	<p>Material residual após extração do colagénio</p> <ul style="list-style-type: none"> • Suspensão em ácido acético 0,5 M (1:2 m/v) e pepsina 0,1 % (m/m); • Diálise contra tampão fosfato 0,2 M a pH 7,2; • Precipitação do colagénio NaCl 2,9 M a pH 7,5; • Diálise; • Liofilização.
Rendimento (%)	23	2,8
Proteína (%)	75	68
Iminoácidos (resíduos/1 000 resíduos)*	15,4	15,5
Espectro UV-Vis (máx.)	227 nm (bom grau de pureza)	-
Cor	Clara (W ≈ 80)	Acinzentada (W ≈ 53)
T_{dd}	32,5 °C	-

*Valor de referência: 141,9 – 190 resíduos/1 000 resíduos.

Tendo em conta os resultados obtidos na extração do colagénio perspectiva-se como trabalho futuro:

- Otimizar as condições de extração do colagénio da pele de PEP para melhorar o rendimento e permitir maior eliminação da gordura e dos pigmentos;
- Aprofundar a caracterização do colagénio da pele de PEP;
- Estudar a utilização do colagénio em produtos alimentares e aplicações em fármacos e produtos cosméticas.

No que respeita à preparação de hidrolisados de colagénio, considera-se importante:

- Otimizar o processo de hidrólise enzimático com aquecimento de micro-ondas;
- Caracterizar e a avaliar as atividades biológicas dos hidrolisados preparados;
- Avaliar as propriedades cosméticas e farmacológicas dos hidrolisados de colagénio.

5. Referências Bibliográficas

- Aberoumand, A. (2012). Comparative study between different methods of collagen extraction from fish and its properties. *World Applied Sciences Journal*, 16(3): 316-319.
- Ahmad, M., Benjakul, S., Nalinanon, S. (2010). Compositional and physicochemical characteristics of acid solubilized collagen extracted from the skin of unicorn leatherjacket (*Aluterus monoceros*). *Food Hydrocolloids*, 24: 588-594.
- Alves, M. (2003). A Reologia. *A Química e a Reologia no Processamento de Alimentos*. Instituto Piaget – Ciência e Técnica, Lisboa, Portugal, pp. 39-61.
- Anal, A. K., Noomhorm, A., Vongsawasdi, P. (2013). Protein hydrolysates and bioactive peptides from seafood and crustacean waste: Their extraction, bioactive properties and industrial perspectives. S. K. Kim (Ed.), *In Marine proteins and peptides: Biological activities and applications*. USA: Wiley-Blackwell publisher, pp. 709 – 735.
- AOAC (1996). Amino Acids in Feeds - AOAC Official Method 994.12, In Helrich, K., *Official Methods of Analysis - Food Composition; Additives; Natural Contaminants*, Association of Official Analytical Chemists, Inc., Vol. I, 15th edition, Virginia, USA, 1298 pp.
- ArtesanalPesca (2016). Peixe-espada Preto. ArtesanalPesca – Organização de Produtores de Pesca, C.R.L. Sesimbra, Portugal. Disponível em: http://www.artesanalpesca.pt/?page_id=383. Acesso: 25/04/2016.
- Bastos, E. (2013). Propriedades reológicas e de estabilização de emulsões do fucopol. Tese de Mestrado em Engenharia Alimentar. Universidade de Lisboa – Instituto Superior de Agronomia, Lisboa, Portugal, 53p.
- Baehaki, A., Lestari, S., Desliani, I. (2016a). Collagen hydrolysis from skin and bone of pangasius catfish prepared by bromelain enzyme and antioxidant activity of hydrolysate. *Der Pharma Chemica*, 8(4): 155-158.
- Baehaki, A., Nopianti, R., Anggraeni, Sh. (2015). Antioxidant activity of skin and bone collagen hydrolyzed from striped catfish (*Pangasius pangasius*) with papain enzyme. *Journal of Chemical and Pharmaceutical Research*, 7(11): 131-135.
- Baehaki, A., Suhartono, M., Sukarno, Syah, D., Setyahadi, S. (2016b). Antioxidant activity of collagen hydrolysates from fish skin with a microbial collagenase. *Der Pharma Chemica*, 7(2): 1677-1682.

- Benjakul, S., Nalinanon, S., Shahidi, F. (2012). Fish Collagen. B. K. Simpson (Ed.), *In Food Biochemistry and Food Processing*. 2nd ed. USA, Wiley-Blackwell publisher, pp. 365 – 387.
- Benjakul, S., Thiansilakul, Y., Visessanguan, W., Roytrakul, S., Kishimura, H., Prodprand, T., Meesaned, J. (2010). Extraction and characterisation of pepsin solubilised collagens from the skin of bigeye snapper (*Priacanthus tayenus* and *Priacanthus macracanthus*). *J Sci Food Agric*, 90(1): 132–138.
- Bligh, E.G., Dyer, W.J. (1959). A rapid method for total lipid extraction and purification. *Canada Journal of Biochemistry and Physiology*, 37(8): 911-917
- Bougatef, A., Nedjar-Arroune, N., Manni, L., Ravallec, R., Barkia, A., Guillochon, D. (2010). Purification and identification of novel antioxidant peptides from enzymatic hydrolysates of sardinelle (*Sardinella aurita*) by-products proteins. *Food Chemistry*, 118: 559-565.
- Caputo, I., Lepretti, M., Scarabino, C., Esposito, C., Proto, A. (2012). An acetic acid-based extraction method to obtain high quality collagen from archeological bone remains. *Analytical Biochemistry*, 421: 92–96.
- Chuaychan, S., Benjakul, S., Kishimura, H. (2015). Characteristics of acid- and pepsin-soluble collagens from scale of seabass (*Lates calcarifer*). *LWT - Food Science and Technology*, 63: 71-76.
- Ding, C., Zhang, M., Li, G. (2014). Rheological properties of collagen/hydroxypropyl methylcellulose (COL/HPMC) blended solutions. *J. Appl. Polym. Sci.*, 131: 40042.
- Duan, R., Zhang, J., Du, X., Yao, X., Konno, K. (2009). Properties of collagen from skin, scale and bone of carp (*Cyprinus carpio*). *Food Chemistry*, 112: 702-706.
- Dybka, K., Walczak, P. (2009). Collagen hydrolysates as a new diet supplement. *Food Chemistry and Biotechnonology*, 73 (1058): 83-92.
- Engel, J., Bächinger, H. P. (2005). Structure, Stability and Folding of the Collagen Triple Helix. *Top Curr Chem*, 247: 7-33.
- Fitch, S. M., Harkness, M.L.R., Harkness, R. D. (1955). Extraction of collagen from tissues. *Nature*, 176: 163.
- Foegeding, E., Lanier, T. C., Hultin, H. O. (1996). Characteristics of edible muscle tissue. In O. R. Fennema (Ed.), *Food chemistry* (3rd ed., pp. 879–942). New York: Marcel Dekker.

- Food and Agriculture Organization of the United Nations (2014). The state of world fisheries and aquaculture. FAO, Rome, Italy. Disponível em: <http://www.fao.org/3/a-i3720e.pdf>. Acesso: 17/04/2016.
- Gelse, K., Pöschl, E., Aigner, T. (2003). Collagens—structure, function, and biosynthesis. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 55: 1531-1546.
- Giraud-Guille, M-M., Besseau, L., Chopin, C., Durand, P., Herbage, D. (2000). Structural aspects of fish skin collagen which forms ordered arrays via liquid crystalline states. *Biomaterials*, 21: 899-906.
- Gómez-Guillén, M.C., Giménez, B., Montero, P. (2005). Extraction of gelatin from fish skins by high pressure treatment. *Food Hydrocolloids*, 19: 923-928.
- Henderson J.W., Ricker R.D., Bidlingmeyer B.A., Woodward C. (2000). Rapid, accurate, sensitive and reproducible analysis of amino acids. Palo Alto, CA: *Agilent Publication, Agilent Technologies*, 5980-1193.
- Heu, M., Lee, J., Kim, H., Jee, S., Lee, J., Jeon, Y-J., Shahidi, F., Kim, J-S. (2010). Characterization of Acid- and Pepsin-soluble Collagens from Flatfish Skin. *Food Sci. Biotechnol.*, 19(1): 27-33.
- Huang, Y., Shiau, C., Chen, H., Huang, B. (2011). Isolation and characterization of acid and pepsin-solubilized collagens from the skin of balloon fish (*Diodon holocanthus*). *Food Hydrocolloids*, 25: 1507-1513.
- INE (2016). Estatísticas da pesca 2015. Instituto Nacional de Estatística, 146p.
- Jain, S., Kaur, H., Pandav, G., Dewan, G., Saxena, D. (2014). Collagen: basis of life. *Universal Research Journal of Dentistry*, 4(1): 1-9.
- Jenkins, C.L. e Raines, R.T. (2002). Insights on the conformational stability of collagen. *Nat. Prod. Rep.*, 19: 49-59.
- Jongjareonrak, A., Benjakul, S., Visessanguan, W., Nagai, T., Tanaka, M. (2005). Isolation and characterisation of acid and pepsin-solubilised collagens from the skin of Brownstripe red snapper (*Lutjanus vitta*). *Food Chemistry*, 93: 475–484.
- Jose, J., e Harrington, W. F. (1964). Role of pyrrolidine in the structure and stabilization of collagen. *Journal of Molecular Biology*, 9, 269–287.

- Juan, H. F., Chang S. C., Huang H. C., Chen S. T. (2005). A new application of microwave technology to proteomics. *Proteomics*, 5, 840–842.
- Kaewdang, O., Benjakul, S., Kaewmanee, T., Kishimura, H. (2014). Characteristics of collagens from the swim bladders of yellowfin tuna (*Thunnus albacares*). *Food Chemistry*, 155: 264–270.
- Kittiphattanabawon, P., Benjakul, S., Visessanguan, W., Kishimura, H., & Shahidi, F. (2010). Isolation and characterisation of collagen from the skin of brownbanded bamboo shark (*Chiloscyllium punctatum*). *Food Chemistry*, 119, 1519-1526.
- Kittiphattanabawon, P., Benjakul, S., Visessanguan, W., Nagai, T., Tanaka, M. (2005). Characterisation of acid-soluble collagen from skin and boné of bigeye snapper (*Priacanthus tayenus*). *Food Chemistry*, 89, 363-372.
- Kim, H. K., Kim, Y. H., Park, H. J., Lee, N. H. (2013). Application of ultrasonic treatment to extraction of collagen from the skins of sea bass *Lateolabrax japonicus*. *Fisheries Science*, 79(5): 849–856.
- Kim, S., Mendis, E. (2006). Bioactive compounds from marine processing byproducts – A review. *Food Research International*, 39: 383-393.
- Kim, S-K., Wijesekara, I. (2010). Development and biological activities of marine derived bioactive peptides: A review. *Journal of Functional Foods*, 2(1): 1–9.
- Lai, G., Li, Y., Li, G. (2008). Effect of concentration and temperature on the rheological behavior of collagen solution. *International Journal of Biological Macromolecules*, 42: 285-291.
- Lee, J., Kang, S., Kim, Y., Kim, M., Heu, M., Choi, B., Kim, J-S. (2016). Comparison of collagen characteristics of sea- and freshwater-rainbow trout skin. *Food Science and Biotechnonoly*, 25(1): 131-136.
- Lee, C. H., Singla, A., Lee, Y. (2001). Biomedical applications of collagen. *International Journal of Pharmaceutics*, 221: 1-22.
- Li, Z.-R., Wang, B., Chi, C.-f., Zhang, Q.-Z., Gong, Y.-d., Tang, J-J., Luo, H-y., Ding G.-f. (2013). Isolation and characterization of acid soluble collagens and pepsin soluble collagens from the skin and bone of Spanish mackerel (*Scomberomorous niphonius*). *Food Hydrocolloids*, 31: 103-113.

- Liang, Q., Wang, L., Sun, W., Wang, Z., Xu, J., Ma, H. (2014). Isolation and characterization of collagen from the cartilage of Amur sturgeon (*Acipenser schrenckii*). *Process Biochemistry*, 49: 318–323.
- Lin, Y., Liu, D. (2006). Comparison of physical–chemical properties of type I collagen from different species. *Food Chemistry*, 99: 244-251.
- Liu, D., Nikoo, M., Boran, G., Zhou, P., Regenstein, J. M. (2015). Collagen and gelatin. *Annual Review of Food Science and Technology*, 6: 527–557.
- Liu, H., Li, D., Guo, S. (2007). Studies on collagen from the skin of channel catfish (*Ictalurus punctatus*). *Food Chemistry*, 101: 621-625.
- Liu, D., Lang, L., Regenstein, J. M., Zhou, P. (2012). Extraction and characterisation of pepsin-solubilised collagen from fins, scales, skins, bones and swim bladders of bighead carp (*Hypophthalmichthys nobilis*). *Food Chemistry*, 133: 1441-1448.
- Liu, D., Wei, G., Li, T., Jinhua Hua, J., Lu, N., Regenstein, J. M., Zhou, P. (2015). Effects of alkaline pre-treatment and acid extraction conditions on the acid-soluble collagen from grass carp (*Ctenopharyngodon idella*) skin. *Food Chemistry*, 172: 836–843.
- López, J., Imperial, S., Valderrama, R., Navarro, S. (1993). An improved Bradford protein assay for collagen proteins. *Clinica Chimica Acta*, 220: 91-100.
- Mahboob, S. (2015). Isolation and characterization of collagen from fish waste material skin, scales and fins of *Catla catla* and *Cirrhinus mrigala*. *Journal of Food Science and Technology*, 52(7): 4296–4305.
- Matmaroh, K., Benjakul, S., Prodpran, T., Encarnacion, A.B., Kishimura H. (2011). Characteristics of acid soluble collagen and pepsin soluble collagen from scale of spotted golden goatfish (*Parupeneus heptacanthus*). *Food Chemistry*, 129(3): 1179–1186.
- Montero, P., Borderías, J. (1990). Gelification of collagenous material from muscle and skin of hake (*Merluccius merluccius* L.) and trout (*Salmo irideus* Gibb) according to variation in pH and the presence of NaCl in the medium. *Z Lebensm Unters Forsch*, 191: 11-15.
- Mora, L., Reig, M., Toldrá, F. (2014). Bioactive peptides generated from meat industry by-products. *Food Research International*, 65: 344–349.

- Muralidharan, N., Shakila, R. J., Sukumar, D., Jeyasekaran, G. (2013). Skin, bone and muscle collagen extraction from the trash fish, leather jacket (*Odonus niger*) and their characterization. *J. Food Sci. Technol.*, 50(6): 1106-1113.
- Muyonga, J.H., Cole, C.G.B., Duodu, K.G. (2004). Characterisation of acid soluble collagen from skins of young and adult Nile perch (*Lates niloticus*). *Food Chemistry*, 85: 81–89.
- Na, G. C. (1988). UV spectroscopic characterization of type I collagen. *Collagen and Related Research*, 8, 315–330.
- Nagai, T., Araki, Y., Suzuki, N. (2002). Collagen of the skin of ocellate puffer fish (*Takifugu rubripes*). *Food Chemistry*, 78: 173-177.
- Nagai T., Tanoue Y., Kai N., Suzuki N. (2015). Characterization of collagen from emu (*Dromaius novaehollandiae*) skins. *J. Food Sci. Technol.*, 52(4): 2344–2351.
- Nagai, T., Suzuki, N. (2000). Isolation of collagen from fish waste material- skin, bone and fins. *Food Chemistry*, 68: 277-281.
- Nalinanon, S., Benjakul, S., Kishimura, H., Osaka, K. (2011). Type I collagen from the skin of ornate threadfin bream (*Nemipterus hexodon*): characteristics and effect of pepsin hydrolysis. *Food Chemistry*, 125: 500-507.
- Nielsen, P. M., Petersen, D., Dambmann, C. (2001). Improved method for determining food protein degree of hydrolysis. *Journal of Food Science*, 66(55): 642-646.
- Norma Portuguesa NP 2032 (2009). Determinação do teor de cinza total. Instituto Português da Qualidade, 7p.
- Norma Portuguesa NP 2282 (2009). Determinação da humidade. Instituto Português da Qualidade, 7p.
- Ogawa, M., Portier, R. J., Moody, M. W., Bell, J., Schexnayder, M. A., Losso, J. N. (2004). Biochemical properties of bone and scale collagens isolated from the subtropical fish black drum (*Pogonia cromis*) and sheepshead seabream (*Archosargus probatocephalus*). *Food Chemistry*, 88: 495-501.
- Oyaizu, M. (1988). Antioxidative activities of browning products of glucosamine fractionated by organic solvent and thin-layer chromatography. *J. Jpn. Soc. Food Sci. Technol.*, 35: 771-775.

- Pal, G. K., Nidheesh, T., Suresh, P. V. (2015). Comparative study on characteristics and in vitro fibril formation ability of acid and pepsin soluble collagen from the skin of catla (*Catla catla*) and rohu (*Labeo rohita*). *Food Research International*, 76: 804–812.
- Pal, K. G., Suresh, P. V. (2016). Sustainable valorisation of seafood by-products: Recovery of collagen and development of collagen-based novel functional food ingredients. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*.
- Pati, F., Adhikari, B., Dhara S. (2010). Isolation and characterization of fish scale collagen of higher thermal stability. *Bioresource Technology*, 101: 3737-3742.
- Picot, L., Ravallec, R., Fouchereau-Péron, M., Vandanjon, L., (2010). Impact of ultrafiltration and nanofiltration of an industrial fish protein hydrolysate on its bioactive properties. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 90(11): 1819–1826.
- Pramanik B. N., Mirza U. A., Ing Y. H., Liu Y-H., Bartner, P. L., Weber, P. C., Bose, A.K. (2002). Microwave-enhanced enzyme reaction for protein mapping by mass spectrometry: a new approach to protein digestion in minutes. *Protein Science*, 11: 2676–2687.
- Ran, X. -G., Wang, L.-Y. (2014). Use of ultrasonic and pepsin treatment in tandem for collagen extraction from meat industry by-products. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 94(3): 585–590.
- Re, R., Pellegrini, N., Proteggente, A., Pannala, A., Yang, M., Rice-Evans, C. (1999). Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radical Biology and Medicine*, 26(9-10): 1231-1237.
- Regenstein, J. M., Zhou, P. (2007). Collagen and gelatin from marine by-products. F. Shahidi (Ed.), In Maximising the value of marine by-products. *Woodhead Publishing Limited: Cambridge England: CRC Press*, pp. 279–303.
- Rest, M., Garrone, R. (1991). Collagen family of proteins. *The FASEB Journal*, 5: 2814-2883.
- Ricard-Blum, S. (2011). The Collagen Family. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 3: 1-19.
- Roughley, P.J., Rauch, F., Glorieux, F. H. (2003). Osteogenesis imperfecta – clinical and molecular diversity. *European Cells and Materials*, 5: 41-47.

- Sadowska, M., Kołodziejka, I., Niecikowska, C. (2003). Isolation of collagen from the skins of Baltic cod (*Gadus morhua*). *Food Chemistry*, 81: 257–262.
- Safandowska, M., Pietrucha, K. (2013). Effect of fish collagen modification on its thermal and rheological properties. *International Journal of Biological Macromolecules*, 53: 32-37.
- Saint-Denis, T., Goupy, J. (2004). Optimization of nitrogen analyser based on the Dumas method. *Analytica Chimica Acta*, 515: 191-198.
- Schrieber, R., Gareis, H. (2007). Gelatine handbook: theory and industry practice. *Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim*, 347p.
- Sealy, J., Johnson, M., Richards, M., Nehlich, O. (2014). Comparison of two methods of extracting bone collagen for stable carbon and nitrogen isotope analysis: comparing whole bone demineralization with gelatinization and ultrafiltration. *Journal of Archaeological Science*, 47: 64-69.
- Shimada, K., Fujikawa, K., Yahara, K., Nakamuea, T. (1992). Antioxidative properties of xanthan on the autoxidation of soybean oil in cyclodextrin emulsion. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 40(6): 945-948.
- Shoulders, M. D., Raines, R. T. (2009). Collagen structure and stability. *Annu Rev Biochem*, 78: 929-958.
- Simopoulos A.P. (1999). Essential fatty acids in health and chronic disease. *Am J Clin Nut*, 70 (suppl): 560S–569S.
- Singh, P., Benjakul, S., Maqsood, S., Kishimura, H. (2011). Isolation and characterisation of collagen extracted from the skin of striped catfish (*Pangasianodon hypophthalmus*). *Food Chemistry*, 124: 97–105.
- Sionkowska, A., Kozłowska, J., Skorupska, M., Michalska, M. (2015). Isolation and characterization of collagen from the skin of *Brama australis*. *International Journal of Biological Macromolecules*, 80: 605–609.
- Skierka, E., Sadowska, M. (2007). The influence of different acids and pepsin on the extractability of collagen from the skin of Baltic cod (*Gadus morhua*). *Food Chemistry*, 105: 1302–1306.
- Sousa, I. (2001). A reologia dos produtos alimentares. Reologia e as suas aplicações industriais. Instituto Piaget – Ciência e Técnica, Lisboa, Portugal, pp. 131-158.

- Suárez-Jiménez, G., Sánchez-Robles, R., Yépiz-Plascencia, G., Hernández-Burgos, A., Ezquerro-Brauer, J. (2015). *In vitro* antioxidant, antimutagenic and antiproliferative activities of collagen hydrolysates of jumbo squid (*Dosidicus gigas*) byproducts. *Food Science and Technology*, 35(3): 421-427.
- Suresh, P. V., Prabhu, G. N. (2013). Seafood. M. Chandrasekaran (Ed.), *In Valorization of food processing by-products*. Taylor & Francis, New York: CRC Press, pp. 685 – 736.
- Tian, Z., Duan, L., Wu, L., Shen, L., Li, G. (2016). Rheological properties of glutaraldehyde-crosslinked collagen solutions analyzed quantitatively using mechanical models. *Materials Science and Engineering C*, 63: 10-17.
- Wang, C., Chang, T., Shi, L., Yang, H., Cui, M., Tambalu, L. (2014). Seafood processing by-products: collagen and gelatin. S.-K. Kim (Ed.), *In Seafood processing by-products: trends and applications*. Springer New York Heidelberg Dordrecht London, pp. 212-216.
- Wang, L., An, X., Yang, F., Xin, Z., Zhao, L., Hu, Q. (2008). Isolation and characterisation of collagens from the skin, scale and bone of deep-sea redfish (*Sebastes mentella*). *Food Chemistry*, 108: 616-623.
- Wang, H., Liang, Y., Wang, H., Zhang, H., Wang, M., e Liu, L. (2014a). Physical-chemical properties of collagens from skin, scale, and bone of grass carp (*Ctenopharyngodon idellus*). *Journal of Aquatic Food Product Technology*, 23(3): 264–277.
- Wang, L., Liang Q., Chen, T., Wang, Z., Xu, J., Ma, H. (2014b). Characterization of collagen from the skin of Amur sturgeon (*Acipenser schrenckii*). *Food Hydrocolloids*, 38: 104-109.
- Wang, B., Wang, Y.-M., Chi, C.-F., Luo, H.-Y., Deng, S.-G., Ma, J.-Y. (2013). Isolation and Characterization of Collagen and Antioxidant Collagen Peptides from Scales of Croceine Croaker (*Pseudosciaena crocea*). *Mar. Drugs*, 11: 4641-4661.
- Yang, M., Guo, Z., Yu, Q., Li, R. (2013). Ultrasonic-assisted extraction of collagen. *Journal of Gansu Agricultural University*, 3, 024.
- Zahrani, R. (2010). Extration and isolation of collagen type I from fish skin. Tese de Mestrado para o grau de Pós-Graduação em Ciência. Universidade de Otago, Dunedin, Nova Zelândia, 52p.

- Zeng, S., Wu, W., Zhang, C. H., Yin, J.J., Li, ZL. (2015). Antioxidant activity of collagen hydrolysate obtained from tilapia scales in vitro and in vivo assays. Proceedings of the 3rd International Conference on Material, Mechanical and Manufacturing Engineering, (Ed.) Prasad Yarlagadda. Atlantis Press, pp. 311-315.
- Zhang, M., Chen, Y., Li, G, Du, Z. (2010). Rheological properties of fish skin collagen solution: effects of temperature and concentration. *Korea-Australia Rheology Journal*, 22: 2.
- Zhang, M., Liu, W., Li, G. (2009). Isolation and characterisation of collagens from the skin of largemouth longbarbel catfish (*Mystus macropterus*). *Food Chemistry*, 115: 826-831.