



**UNIVERSIDADE DA INTEGRAÇÃO INTERNACIONAL DA
LUSOFONIA AFRO-BRASILEIRA- UNILAB
INSTITUTO DE ENGENHARIA E DESENVOLVIMENTO
SUSTENTÁVEL – IEDS**

**MESTRADO ACADÊMICO EM SOCIOBIODIVERSIDADE E
TECNOLOGIAS SUSTENTÁVEIS - MASTS**

**EXTRAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE COLÁGENO PROVINDO DE *Gallus gallus domesticus*:
DESENVOLVIMENTO DE TECNOLOGIAS PARA O TRATAMENTO DE
LESÕES CUTÂNEAS**

JOSÉ JONATHAS ALBUQUERQUE DE ALMEIDA

REDENÇÃO

2018



ALUNO: JOSÉ JONATHAS ALBUQUERQUE DE ALMEIDA

EXTRAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE COLÁGENO PROVINDO DE *Gallus gallus domesticus*: DESENVOLVIMENTO DE TECNOLOGIAS PARA O TRATAMENTO DE LESÕES CUTÂNEAS

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Sócio biodiversidade e Tecnologias Sustentáveis – MASTS da Universidade da Integração Internacional da Lusofonia Afro-Brasileira – Campos das Auroras – Ce como requisito parcial para obtenção do Título de Mestre.

Linha de Pesquisa: Tecnologia e desenvolvimento Sustentável

Orientador: Prof. Dr. Aluísio Marques da Fonseca

REDENÇÃO

2018

Universidade da Integração Internacional da Lusofonia Afro-Brasileira
Sistema de Bibliotecas da UNILAB
Catalogação de Publicação na Fonte.

Almeida, Jose Jonathas Albuquerque de.

A444e

EXTRAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE COLÁGENO PROVINDO DE Gallus gallus domesticus: DESENVOLVIMENTO DE TECNOLOGIAS PARA O TRATAMENTO DE LESÕES CUTÂNEAS / Jose Jonathas Albuquerque de Almeida. - Redenção, 2019.

133f: il.

Dissertação - Curso de Sociobiodiversidade E Tecnologias Sustentáveis, Mestrado Acadêmico Em Sociobiodiversidade E Tecnologias Sustentáveis, Universidade da Integração Internacional da Lusofonia Afro-Brasileira, Redenção, 2019.

Orientador: Prof. Dr. Aluísio Marques da Fonseca.

1. Colágeno. 2. Gallus gallus domesticus. 3. Extração. 4. Tratamentos de lesões cutâneas. I. Fonseca, Prof. Dr. Aluísio Marques da. II. Título.

CE/UF/BSCL

CDD 000

JOSÉ JONATHAS ALBUQUERQUE DE ALMEIDA

EXTRAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE COLÁGENO PROVINDO DE *Gallus gallus domesticus*: DESENVOLVIMENTO DE TECNOLOGIAS PARA O TRATAMENTO DE LESÕES CUTÂNEAS

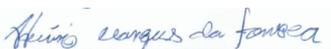
Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Sócio biodiversidade e Tecnologias Sustentáveis – MASTS da Universidade da Integração Internacional da Lusofonia Afro-Brasileira – Campos das Auroras – Ce como requisito parcial para obtenção do Título de Mestre.

Linha de Pesquisa: Tecnologia e desenvolvimento Sustentável

Orientador: Prof. Dr. Aluísio Marques da Fonseca.

Aprovado em 21 de dezembro de 2018.

BANCA EXAMINADORA



Prof.º Dr. Aluísio Marques da Fonseca (Orientador)
Universidade da Integração Internacional da Lusofonia
- AfroBrasileira (UNILAB)



Prof.ª Dra. Regilany Paulo Colares (1ª membro)
Examinadora Externa ao Programa -
Universidade da Integração Internacional da Lusofonia
- AfroBrasileira (UNILAB)



Prof.ª Dra. Olenaide R de Oliveira Pinto (2ª membro)
Examinadora Interna ao Programa -
Universidade da Integração Internacional da Lusofonia
- AfroBrasileira (UNILAB)



Prof.º Dr. Juan Carlos Alvarado Alcicer (3ª membro)
Universidade da Integração Internacional da Lusofonia
- AfroBrasileira (UNILAB)

RESUMO

As lesões cutâneas são consideradas um problema de saúde pública, acometendo a população independente do sexo, idade, etnia e cultura. Podendo ocasionar negativamente na qualidade de vida dos pacientes em virtude da área atingida. Sabe-se que o processo de cicatrização da pele acontece por meio da deposição de alguns componentes, dentre estes, o colágeno pode influenciar positivamente no processo de cicatrização, por ser a proteína mais abundante no organismo e estando presente em grande quantidade na conjuntura tecidual, matriz celular, e tecido conjuntivo. Dentro deste contexto o objetivo desse trabalho foi Extrair, caracterizar e desenvolver uma formulação em gel contendo colágeno provido de pés de *Gallus gallus domesticus*. Sendo um estudo exploratório e descritivo com abordagem quantitativa, no qual utilizamos matéria prima os pés de *Gallus gallus domesticus*, fazendo-se uso de três métodos de extração sendo o primeiro por Liu (2010) com algumas modificações, o segundo métodos com a utilização de soluções em meio ácido e básico em diferentes concentrações, tendo como referência o método de Liu (2010) e terceiro método o emprego de técnica com aquecimento e pressão. Sendo realizada a caracterização das amostras mediante emprego da Espectroscopia de Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR), Espectrofotometria de Absorção no UV-VIS, eletroforese, quantificação de proteína, teste bacteriológico, Cromatografia Permeável em Gel (GPC) e teste da toxicidade por meio da Artêmias Salina. Mediante realização do FTIR foi possível ter a identificação dos grupos funcionais de amida I, II e III que constitui o processo de caracterização da estrutura do colágeno nas amostras. No que trata a quantificação de proteína foi possível identificar a existência da mesma em todas as amostras em algumas em maior concentração proteica em outras menos. Os resultados obtidos na análise de Espectrofotometria de Absorção no UV-VIS caracteriza existência dos grupos funcionais e constituintes do colágeno, estando presente em todas as amostras, no qual, tais gráficos dos extratos testados são similares ao gráfico obtido do colágeno padrão, tanto na estrutura do desenho do gráfico bem como, no registro dos picos e seus valores. Sobre o resultado do GPC notou-se que apesar da variação do peso molecular dos extratos, existiu certa aproximação dos picos e massa molecular com o valor encontrado do padrão, assim como, a constituição dos gráficos, distribuição da massa foi identificado apenas um pico que referência um único elemento nos extratos, sendo estes similares. Concluiu-se que, mediante os três métodos de extração utilizados foi possível obter material colagenoso do tipo I provido dos pés de *Gallus gallus domesticus*, no qual, o terceiro método de extração foi mais viável quando comparado com os outros dois métodos em virtude da não utilização do emprego de agentes químicos para a obtenção do extrato e não necessidade de equipamentos específicos, sendo possível obter uma quantidade expressiva e dispondo a constituição de produtos a base deste colágeno sem emprego e associação com outros agentes.

Palavras-chave: Colágeno, *Gallus gallus domesticus*, Extração, Tratamentos de lesões cutâneas.

ABSTRACT

Skin lesions are considered a public health problem, affecting people regardless of gender, age, ethnicity and culture. They can cause a negative impact on patients' quality of life by virtue of the affected area. It is known that the healing process of skin happens through the deposition of some components; among these, collagen can positively influence the healing process because it is the most abundant protein in the body, being present in great quantities on tissue, the cell array environment, and connective tissue. The objective of this work was to extract, characterize and develop a gel formulation containing collagen from the feet of *Gallus gallus domesticus*. Being an exploratory, descriptive study with a quantitative approach, in which the feet of *Gallus gallus domesticus* were used as raw materials, employing three extraction methods: Liu (2010) with some modifications; using solutions in acidic and alkaline environments at several concentrations with Liu (2010) as a reference; and by applying heat and pressure. The samples were characterized by use of Fourier-transform infrared spectroscopy (FTIR), UV-VIS absorption spectrophotometry, electrophoresis, protein quantification, bacteriological testing, gel permeation chromatography (GPC) and toxicity test (*Artemia salina*). Upon completion of FTIR there was identification of the amide functional group I, II and III which constitutes the process of characterization of the collagen structure in the samples. In regard to protein quantification, it was present in every sample but in varying amounts. The results obtained on UV-VIS analysis indicate the existence of the constituents of the collagen in all samples; the graphs resulting from the examined extracts were similar to that obtained from standard collagen, both in the shape of the graph and as in the peak values. As for the result of the GPC, it was found that despite the variation in the molecular weight of the extracts, there was a degree of similarity to the standard in the peaks and molecular weight. It was concluded that type I collagen material is obtainable from the feet of *Gallus gallus domesticus* using all three extraction methods, among which the third method was considered the most viable in virtue of forgoing the usage of chemical agents or specific equipment to produce the extract, allowing for the production of expressive quantities and the manufacture of collagen products without utilization of other chemicals.

Keywords: collagen, *Gallus gallus domesticus*, characterization, treatment of cutaneous injuries.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Representação das características estruturais da tripla hélice do colágeno e sua formação a partir de suas cadeias alfas.....	13
Figura 2 - Estrutura do colágeno. (a) forma da triplete presentes nas matrizes colagênicas; (b) tropocolageno, (c) hélice tripla do colágeno.....	15
Figura 3 - Algoritmo do processo de formação e estruturação do colágeno.....	18
Figura 4 - Demonstrativa de uma constituição tecidual a base de matéria colagenosa.	24
Figura 5 - Etapa do processo de extração por meio do método de Liu (2010).....	34
Figura 6 - Etapa final do processo de extração por meio do método de Liu (2010).....	35
Figura 7 - Processo de neutralização e verificação do pH das amostras.....	36
Figura 8 – Amostras providos dos pés de gallus gallus domesticus obtidas por meio ácido e básico submetidas ao processo de liofilização.....	37
Figura 09 – Meio de culturas e preparação das placas de Petri para teste bacteriológico.....	41
Figura 10 – Etapas do processo de semeadura e cultivo de microrganismos	42
Figura 11 – Demarcação da implantação dos discos na placa de Petri com meio de cultura.....	44
Figura 12 – Colocação dos extratos de colágenos em disco na placa de Petri com microrganismos semeado.....	45
Figura 13 – Confecção dos poços na placa de Petri com microrganismos semeado.....	46
Figura 14 – Processo de pipetagem de amostras de colágeno e extratos obtidos por meio ácido e básico dos pés de gallus gallus domesticus junto a placas de Peris semeadas.....	46
Figura 15 - Etapa do processo de quantificação de proteína.....	49
Figura 16 – Representação de algumas etapas do processo de eletroforese desta pesquisa.....	53

Figura 17- Esquema ilustrativo do sistema desenvolvido para eclosão dos cistos da <i>Artemia salina</i>	56
Figura 18 – Amostras em contato com a solução utilizada e seu registro no decorrer do processo de extração método de Liu (2010)..	58
Figura 19 – Processo de separação de substâncias/filtração.....	69
Figura 20 – Extratos e resíduos obtidos mediante solução de Hidróxido de sódio em diferentes concentrações.....	61
Figura 21 – Extrato líquido obtido por hidróxido de amônia e submetido ao processo de liofilização.....	62
Figura 22- Extrato líquido obtido da solução ácido acética em diferentes concentrações.....	64
Figura 23 - Extrato obtido por meio do ácido acético mediante processo de liofilização	65
Figura 24 – Amostras de <i>gallus gallus domesticus</i> obtidas por meio de aquecimento e pressão submetidas a processo de liofilização	68
Figura 25 - Amostra de <i>gallus gallus domesticus</i> obtidas por meio de aquecimento e pressão submetidas a estufa.....	69
Figura 26 - Cultivo em estufa microbiológica e resultados obtidos por meio dos extratos e elemento controle.....	71
Figura 27 - Espectroscopia de infravermelho – FTIR do colágeno hidrolisado.....	74
Figura 28 - Espectroscopia de infravermelho – FTIR para amostra A1 extrato mediante aquecimento e pressão com osso liofilizado.....	76
Figura 29 - Espectroscopia de infravermelho – FTIR para amostra A2 extrato por meio aquoso com osso submetido em pressão e estufa.....	78
Figura 30 - Espectroscopia de infravermelho – FTIR para amostra A3 extrato ácido acético liofilizado a 1 mol.....	81

Figura 31 - Espectroscopia de infravermelho – FTIR para amostra A4 extrato de meio aquoso somente de pés submetidos ao processo de liofilização.....	83
Figura 32 - Espectroscopia de infravermelho – FTIR para amostra A5 extrato de raspa de pés de frango por hidróxido de sódio a 1 mol	86
Figura 33 –Espectro de absorção UV-VIS do colágeno padrão hidrolisado que é comercializado.....	88
Figura 34 - Espectro de absorção UV-VIS do colágeno padrão hidrolisado e amostras A1, A2, A3.....	89
Figura 35 - Espectro de absorção UV-VIS do colágeno padrão hidrolisado e amostras A4, A5, A6 ..	90
Figura 36 -Espectro de absorção UV-VIS do colágeno padrão hidrolisado diluído em solução tampão, ácido acético a 0,5 mol, Dimetilsulfóxido – DMSO e solução tampão, Água Milli-Q.....	91
Figura 37 - Gráfico de quantificação de proteínas e soluções diluentes das amostras..	92
Figura 38 - Gráfico das amostras/extratos submetidas a cromatografia permeável em gel – GPC.....	97
Figura 39 - Gráfico do colágeno padrão submetido a cromatografia permeável em gel – GPC.....	97
Figura 40 - Massa molecular e polidispersividade das amostras extraídas dos pés de gallus gallus domesticus e colágeno padrão.....	99
Figura 41 - Eletroforese e registro de bandas de peso molecular reveladas no gel de poliacrilamida.....	102

LISTA DE TABELA

A Tabela 1- Número de resíduos de aminoácidos que se encontra presentes na estrutura de tripla-hélice do colágeno tipo 1.....	12
Tabela 2 – Relação dos microorganismos utilizados em teste bacteriológico com registro de ATCC e Perfil de Controle utilizado.....	40
Tabela 3: Valor espectrofotômetro das amostras diluídas em água destilada para cultivo.....	44
Tabela 4- Registro de peso das amostras durante processo de extração.....	59
Tabela 5: Registro de peso da amostra submetida em solução de hidróxido de sódio nas concentrações de 0,1 vidro I, 0,5 vidro II e 1 mol vidro III.....	61
Tabela 6 - Registro de peso da amostra submetida em solução de hidróxido de amônia nas concentrações de 0,1 vidro I, 0,5 vidro II e 1 mol vidro III.....	63
Tabela 7: Registro de peso da amostra submetida em solução de ácido nas concentrações de 0,1 vidro I, 0,5 vidro II e 1 mol vidro III.....	64
Tabela 8- Registro de peso da amostra submetida em solução de ácido acético ácido nas concentrações de 0,1 vidro I, 0,5 vidro II e 1 mol vidro III.....	65
Tabela 09: Principais grupamentos observados no espectro de infravermelho –FTIR do colágeno hidrolisado.....	74
Tabela 10 - Principais grupamentos observados no espectro de infravermelho –FTIR da amostra A1 extrato mediante aquecimento e pressão com osso liofilizado que envolva grupos funcionais de colágeno.....	76
Tabela 11- Principais grupamentos observados no espectro de infravermelho –FTIR da amostra A2 extrato por meio aquoso com osso submetido de pressão e estufa e principais grupos funcionais que remete o colágeno.....	79
Tabela 12: Principais grupamentos observados no espectro de infravermelho – FTIR da amostra A3 extrato ácido acético liofilizado á 1 mol com seus principais grupos funcionais que remete o colágeno.....	81

Tabela 13: Principais grupamentos observados no espectro de infravermelho –FTIR da amostra A4 extrato de meio aquoso somente de pés submetidos ao processo de liofilização..... 83

Tabela 14 - Determinação de proteínas totais via espectrofotometria $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ - de ambos os extratos e soluções diluentes..... 95

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

FTIR -	Espectroscopia de infravermelho com transformação de Fourier
GPC -	Cromatografia de permeação em gel
MEV-	Microscopia eletrônica de varredura
IBAMA-	Conselho Nacional do Meio Ambiente
ONU -	Organização das Nações Unidas
GEE-	Gases de efeito estufa
DNA -	Ácido Desoxirribonucleico
ECM-	Matriz extracelular
Gly –	Glicina
PRO-	Prolina
Hypro –	Hidroxiprolina
nm-	Nanômetro
kDA -	Unidade de massa atômica em Dalton
g/MOL -	Unidade Grama por Mol
ET -	Engenharia de Tecido
CGC-	Cultura de gel de colágeno
BSE -	Encefalopatia espongiforme bovina
CF-	Fibras de colágeno
BC-COL	Hidrogel de colágeno
SED -	Síndrome de Ehlers Danlos
Kg-	Quilograma
CIALNE -	Companhia de Alimento do Nordeste
ATCC -	American Type Culture Collection
mL-	Mililitro
mg-	Miligrama

μL -	Microlitro
μg -	Micrograma
UV-VIS-	Espectroscopia de absorção UV

SUMÁRIO

RESUMO

ABSTRACT

LISTA DE FIGURAS

LISTA DE TABELAS

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

1	INTRODUÇÃO	01
1.1.	Caracterização do problema	03
2	OBJETIVOS	05
3	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	06
3.1.	Produção avícola	06
3.1.2	Impactos gerados pela produção	07
3.2.1	Proteínas e matriz extracelular	09
3.3.1	Colágeno	10
3.3.2	Estrutura e composição do colágeno	11
3.3.3	Processo de formação do colágeno	15
3.3.4	Tipos de colágeno	19
3.3.5	Algumas formas em que o colágeno é encontrado e comercializado	27
3.3.6	Utilização do colágeno para o tratamento de lesões	29
4.	MATERIAL E MÉTODOS	32
4.1	Tipo de estudo	32
4.2	Local do estudo	32
4.3	Matéria-prima de Estudo/ Amostras	32
4.4.	Amostra do colágeno padrão	33
5.1	Extração do colágeno a partir de resíduos da indústria avícola	34
5.2.	Testes bacteriológicos	40
5.2.1	Preparo das placas com microorganismos para teste	41
5.2.2	Preparo da solução e extrato de colágeno para teste bacteriológico	43
5.2.3	Preparação de placas e material colagenoso	43
6.1	Espectroscopia de Absorção na Região do Infravermelho (FTIR)	47
6.2	Cromatografia de Permeação em Gel	47
6.3	Métodos de Quantificação de Proteínas	47
6.4	Espectroscopia UV-visível de colágeno	49

6.5 Eletroforese	49
6.5.1 Preparo do gel.....	50
6.5.2 Preparação da solução de corrida.....	51
6.5.3 Preparo das amostras para eletroforese	51
6.5.4 Lavagem do gel de corrida/eletroforese	52
6.6 Ensaio de toxicidade do extrato com a <i>Artemia salina</i>	55
6.6.1 Bioensaio com <i>Artemia Salina</i>	56
6.6.2 Preparação das amostras com <i>Artemia salina</i>	56
6.6.3 Contagem das <i>Artemia salina</i>	57
7. RESULTADOS E DISCUSSÃO	58
7.1 Método de Extração	67
7.2 Teste bacteriológico	70
7.3 Espectroscopia de Absorção na Região do Infravermelho (FTIR)	73
7.4. Espectroscopia UV-visível de colágeno	88
7.5 Quantificação de Proteínas	92
7.6 Cromatografia de Permeação em Gel (GPC)	96
7.7 Eletroforese	101
7.8 Ensaio de toxicidade do extrato com a <i>Artemia salina</i>	104
8 CONCLUSÃO	106
9 BIBLIOGRÁFICOS	108

1. INTRODUÇÃO

As afecções cutâneas “lesões/feridas” são consideradas um problema de saúde pública, acometendo a população independente do sexo, idade, etnia e cultura. Podendo ocasionar incapacidade funcional mediante área atingida no organismo humano, bem como, resultando negativamente na qualidade de vida dos pacientes devido as características que tais lesões apresentam como odor, secreção, exsudato e forma (MORAIS; OLIVEIRA; SOARES, 2008).

Em todo o mundo, existe mais de 110 milhões de incisões cirúrgicas por ano, enquanto feridas traumáticas dispõem uma taxa de 1,6 milhões de novos casos/ano (OVIEDO-RONDÓN, 2008). No que refere as úlceras por pressão têm um quadro de incidência de aproximadamente 8,5 milhões no mundo. Por outro lado, a úlcera venosa e as lesões diabéticas representam 12,5 e 13,5 milhões de novos casos, respectivamente (LAWALL, 2012).

Contudo, quando acometidos por determinado trauma que envolva quedas, batidas, acidentes, brigas dentre outros, um dos primeiros órgãos a sofrer danos no ato do trauma é a pele, tecido epitelial, tecido conjuntivo e muscular, na grande maioria dos casos. Porém não se existe indicadores estatísticos que trate com certa precisão o valor quantitativo das lesões cutâneas, mas se sabe que estas são encontradas em ambientes hospitalares, unidades básicas de saúde, clínicas de feridas e comunidade.

O processo de cicatrização da pele acontece a partir da deposição dos componentes, dentre eles, o colágeno que ao longo do tempo vai diminuindo a sua produção pelo organismo podendo ocasionar retardamento do processo de regeneração e cicatrização tecidual, bem como influenciar no aparecimento de outras patologias e flacidez tecidual. Sendo importante assim buscar novas fontes para reposição deste colágeno, tendo em vista que é uma substância fundamental para o organismo humano (GASPAR et al., 2010).

Por constituir aproximadamente 25 a 30% do total de toda a proteína encontrada no organismo humano, é tida como um elemento fundamental para a constituição tecidual da matriz celular, dando suporte as células do corpo humano durante todo o período da vida (DUARTE, 2011). As fibras de colágeno desempenham diversas funções no corpo humano, como: manter as células unidas e fortalece-las, ajudando no processo de cicatrização e regeneração tecidual, por ser um dos

constituintes essenciais para ativação da cascata de cicatrização dos tecidos (CAMPOS; BORGES-BRANCO; GROTH, 2007).

Conforme estudos realizados com matérias a base de colágeno refere sua importância no corpo humano, tendo em vista que esta proteína desempenha múltiplas funções estruturais nos diferentes tecidos em específico nos músculos e ajudando no processo de cicatrização das lesões cutâneas (CALVI et al., 2012). ‘

No que trata as práticas de cuidados das lesões cutâneas ao longo dos anos, é notório um avanço e aprofundamento no contexto técnico-científicos para desenvolvimento de novos produtos que viabilize o processo de cicatrização das lesões cutâneas a base de colágeno, em virtude da alta concentração do mesmo no organismo humano, e características que esta proteína apresenta. Assim, tem-se buscado novas tecnologias e fontes de colágeno que possa dispor matéria prima para o desenvolvimento de novos produtos para o tratamento das lesões (WAIDMAN et al., 2011).

Classicamente, o colágeno hidrolisado encontrado em farmácias de manipulação e estabelecimentos comerciais é proveniente de origem animal, sendo este extraído do couro, ossos de animais bovinos e suínos. Contudo, atualmente novas pesquisas são desenvolvidas para extrair colágeno de outras fontes, a exemplo, de peixes e aves, objetivando viabilizar sua obtenção e produção.

Dentro desta linha de pesquisa, resíduos da indústria avícola (pé e carcaça) podem se dispor como nova fonte de obtenção de colágeno, tendo em vista a grande produção avícola, a fácil acessibilidade de matéria-prima por ser um rejeito, podendo conter valor proteico significativo no pé de frango (*Gallus gallus domesticus*). Este colágeno pode vir a ser uma matéria-prima de baixo custo e fácil acessibilidade (DE ALMEIDA; FARIAS; SANTANA, 2012), podendo se tornar um importante constituinte para a reposição das taxas de colágeno no organismo, bem como favorecer no processo de cicatrização e regeneração tecidual das lesões cutâneas mediante análise realizadas.

Entretanto, não foi encontrado na literatura e nos bancos de dados pesquisados descrições sobre o processo de aplicação ou desenvolvimento de produto extraído por meio de colágeno provindo dos pés *Gallus gallus domesticus* com aplicabilidade no tratamento e prevenção de lesões cutâneas, bem como desenvolvimento de produtos com esse objetivo.

1.1 CARACTERIZAÇÃO DO PROBLEMA

O consumo de carne avícola vem apresentando forte crescimento nos fatores produtivos e comerciais, nos quais o Brasil se destacou no mercado internacional como um dos maiores produtores mundiais de carne avícola, acarretando uma produção em massa (NASCIMENTO et al., 2011).

Essa produção avícola gerou impactos decorrentes dos resíduos (pés, pele, carcaça e penas), que em alguns momentos são descartados no meio ambiente (OVIEDO-RONDÓN, 2008). Em favor disso, as áreas da engenharia de alimentos e zootecnia se destacaram em pesquisas sobre o aproveitamento destes resíduos, identificando, por exemplo, que os pés de aves da espécie *Gallus gallus domesticus* são excelentes fontes de gelatina, podendo ser utilizados como matéria-prima para produção de cosméticos e estéticos, de elevada aceitação comercial, com alto valor no mercado mundial (JÚNIOR; ORRICO; JÚNIOR, 2010).

Podendo configurar-se como elemento base para desenvolvimento de biomateriais e artigos na área hospitalar, especificando-se no campo da estomatoterapia tendo em vista os altos índices de portadores de lesões cutâneas, bem como, elevados gastos e despesas referentes ao consumo de produtos para tratamento destas lesões para os órgãos públicos e sociedade em geral. Criando assim, possíveis barreiras e obstáculos no que trata o tratamento de feridas no contexto geral.

No que trata os biomateriais criados a partir do colágeno representam alternativas terapêuticas na área médica e odontológica, tendo biocompatibilidade de promover, e ajudar no processo de cicatrização de feridas, diminuindo no tempo de internação, e gastos hospitalares de pessoas acometidas por este problema tendo em vista o grande número de pessoas acometidas por lesões cutâneas. (SILVA et al., 2009).

Os produtos para o tratamento das afecções cutâneas muitas vezes são de difícil acesso pelo alto valor aquisitivo o que limita o poder de compra e, conseqüentemente, favorece no desenvolvimento da lesão e maior tempo do trauma (FRANCO; GONÇALVES, 2008). Por estes aspectos e dados já descritos, surge a necessidade de investir e desenvolver produtos que tenham boa aplicabilidade e ação efetiva no processo de cicatrização das lesões.

Acreditamos que os biomateriais criados a partir do colágeno representam alternativas terapêuticas na área médica e odontológica, tendo biocompatibilidade de

promover, e ajudar no processo de cicatrização de feridas, diminuindo no tempo de internação e gastos hospitalares de pessoas acometidas por este problema (SILVA et al., 2009).

Assim, tais questionamentos acarretou uma investigação mais aprofundada dos inúmeros papéis que o colágeno pode possibilitar no corpo humano, tendo em vista que esta proteína desempenha múltiplas funções estruturais nos diferentes tecidos, especificamente nos músculos e regeneração tecidual (CALVI et al., 2012).

Partindo do pressuposto, nos perguntamos se uma formulação em gel contendo colágeno provido de *gallus gallus domesticus* poderá influenciar no processo de cicatrização e regeneração celular quando realizado a aplicação sobre a lesão ?

E quando realizado o processo de extração e caracterização deste colágeno de origem animal, será uma fonte acessível e viável envolvendo o processo de Tecnologias Sustentáveis?

Visando buscar respostas para estas perguntas, este trabalho possui os objetivos descritos a seguir.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Extrair, caracterizar e desenvolver uma formulação em gel contendo colágeno provido de pés de *Gallus gallus domesticus*

2.2 Objetivos Específicos

- a) Extrair o colágeno de *Gallus gallus domesticus* pelo método estabelecido por Liu, 2010;
- b) Caracterizar o colágeno extraído de *Gallus gallus domesticus*;
- c) Quantificar o índice de colágeno;
- d) Identificar a presença de toxicidade dos extratos obtidos;
- e) Desenvolver um sistema farmacêutico de gel a base do colágeno;

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1. Produção avícola

O Brasil é privilegiado por ter uma grande extensão territorial, condições climáticas, terras férteis e mananciais, que proporciona criação de extensos campos de grãos, lavouras, rebanho e criatórias. O que torna um dos maiores produtores e exportadores de bens e produtos, destacando-se principalmente no setor de carnes. Vale ressaltar que cerca de 40 % de toda a carne consumida no mundo é produzido em nosso território com maior concentração desta produção na região sul, segundo o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA, 2014).

É visto que existe uma grande demanda por parte dos mercados internos e externos para comercialização e consumo da carne de frango em específico, por ser uma fonte de proteína animal saudável com boas características nutricionais. Dispondo ainda, com valor acessível de compra e tempo de produção menor, quando comparado com a produção da carne bovina, suína, peixe dentre outros.

No entanto, tal produção do frango de corte tem mostrado eficiência e retorno econômico rápido quando observado o tempo de vida e cadeia produtiva que gira em torno de 01 a 45 dias, consumo pequeno de certo coeficiente de ração/grãos, uso de água, energia e espaço para sua criação quando comparado com outras cadeias produtivas de proteína animal, se tornando viável sua produção quando observado os fatores de abate e comercialização, gastos e manejo (OVIEDO-RONDÓN, 2008).

A criação de frangos ou atividade de produção avícola é encontrada facilmente em diferentes regiões, áreas e locais no território brasileiro, a princípio encontra-se pequenos criadores mantendo tal hábito em quintais de suas residências urbanas ou rurais, no qual, o intuito de manter esse costume envolve principalmente a questão do consumo alimentar, e em alguns casos a comercialização.

Com o aumento da população mundial o setor agropecuário precisa consequentemente aumentar sua eficiência produtiva para conseguir alimentar tal população (CROSSON et al., 2011). Assim, quanto maior o número populacional maior demanda alimentar, e consequentemente maior oferta dos produtores para suprir as necessidades do mercado, onde podemos dizer que é uma equação inversamente proporcional envolvendo os setores alimentares e produtivos.

Segundo um estudo apresentado na revista de avicultura industrial em 2014, refere que a carne avícola é a segundo mais consumida no mundo, tendo sua produção de 106 milhões de toneladas ao ano em média, no Brasil estimasse uso desta proteína animal de 42 kg por habitante/ano referido assim a principal escolha dos brasileiros quando observado a produção e venda. Vale ressaltar que a carne suína é a mais consumida de todas até o presente momento. Em quanto isso [...]

A cadeia produtiva da avicultura de corte é, provavelmente, uma das cadeias produtivas brasileiras com maior nível de coordenação/produção, conferindo-lhe competitividade no mercado mundial. Esta pode ser desmembrada em quatro grandes segmentos: produção de insumos, produção rural, industrialização e comercialização/distribuição (MIRITZ; TIMM; FILHO, 2015).

Conforme Associação Brasileira de Proteína animal no ano de 2014 foi produzida cerca de 12,692 milhões de toneladas de carne de frango no Brasil, tendo um aumento na escala produtiva de 3,12 % quando comparado ao ano de 2013. Onde tal crescimento é acompanhado com quantidades de resíduos gerados por esta produção, remetendo assim certa preocupação sobre estes resíduos e produção de carnes (FERREIRA et al., 2018).

3.1.1 Impactos gerados pela produção

O Conselho Nacional do Meio Ambiente – IBAMA por meio da resolução do Conama nº 001 de 23 de janeiro de 1986, definiu o impacto ambiental como sendo qualquer alteração das propriedades biológicas, físicas e químicas do meio ambiente causada por qualquer forma de matéria ou energia resultante das atividades humanas que direta ou indiretamente ocasione danos a saúde, bem-estar, segurança, atividades sociais, sanitárias, socioeconômicas do meio ambiente ou qualquer de seus recursos ambientais.

Ao produzir algo teremos como consequência a geração de certos resíduos, onde na sua grande maioria é proveniente da indústria, comércio, residências, produção e criação dentre outros; portanto quando não realizado o processo de reutilização e sustentabilidade poderá acarretar danos ambientais que venha comprometer a evolução e sobrevivência de muitas espécies humanas por meio de tais impactos gerados em médio e longo prazo.

Estudos já realizados remetem uma preocupação a respeito destes resíduos que são gerados pela etapa produtiva, repercutindo em sérios problemas e danos a saúde, bem estar, qualidade de vida e contexto ambiental no que refere (solo, ar, paisagem, água e vegetações), quando não atentado para cuidados de preservação e aproveitamento destes resíduos gerados pela esfera de consumo e produção industrial adotada pelo homem (FERREIRA et al., 2018).

Influenciando assim, no aumento do aquecimento global, inundações, poluição de mananciais, mangues, desertificação, erosões, desaparecimento de vegetações, migração de animais, processo de extinção de espécies, mudança climáticas, chuvas ácidas, destruição de habitats, limitação de produções principalmente agrária, assim como escassez dos recursos naturais e seus bens e serviços.

Em âmbito social poderá aumentar o número de doenças atingindo tanto a população como todo o reino animal quando não tomadas ações e medidas que venha reduzir os impactos ambientais nesta conjuntura social.

Deste modo, sabe-se que a população mundial vem crescendo e tende aumentar, com o passar dos anos, de acordo com a projeção demográfica da Organização das Nações Unidas – ONU 2013, aponta que o número populacional chegará a 8,5 bilhões até 2030, tendo aumento de 1 bilhão de pessoas em 13 anos com perspectiva para 2050 de crescimento do índice populacional aproximadamente para 9,8 bilhões de pessoas no mundo (ONU, 2013).

Porém consideram-se os principais geradores de resíduos, principalmente sólidos, pessoas físicas ou jurídicas de direito público ou privado, ou qualquer um que pratique atos de atividade de consumo, produção, comercialização conforme a Lei 12.305/2010, que institui a Política Nacional de Resíduos Sólidos. Conforme anunciado devemos pensar sobre a geração de resíduos e ter percepção de que tal quantidade de resíduo estar correlacionada com o quantitativo populacional, comercialização e produção de alimentos, para suprir as necessidades básicas do meio social e populacional. Vale ressaltar que [...]

A indústria de alimentos é uma das maiores indústrias do mundo, o que resulta em maior consumo de energia e recursos. A contribuição do agro-alimentar para questões ambientais como a redução de recursos, as emissões atmosféricas e a degradação da terra é significativa. Além disso, há relatos de que, nos países desenvolvidos, os consumidores exigem alimentos sem prejudicar o meio ambiente. Como resultado, avaliar o impacto ambiental dos

produtos agroalimentares é primordial para melhorar os desempenhos energéticos e ambientais do setor alimentar (KALHOR et al., 2016).

Segundo Macleod et al. (2012), os envolvidos no fornecimento e cadeia produtiva de alimentos, derivados e produtos tem enfrentado certa estorvo sobre utilização de recursos e escases dos mesmos para manter ativo suas produções em específico na parte de alimentos devido aos impactos que são gerados por estes resíduos.

É importante manter indicadores que vises estudar e avaliar os impactos que são gerados pela produção de carne avícola, bem como, a degradações das terras de cultivos, e reutilização destes resíduos para produção de novos compostos e produtos, tendo em vista certos componentes que podem dispor de bom valor proteico relativo. Garantindo assim, ciclo produtivo seguro e livres de possíveis problemas que possam ser desencadeado as gerações futuras.

3.2 Proteínas e matriz extracelular

As proteínas são um dos compostos orgânicos mais abundantes na estrutura corpórea do corno humano, animal e vegetais, sendo estas moléculas orgânicas de elevada massa molecular constituídas por combinações entre aminoácidos, contendo estrutura quaternária de carbono, hidrogênio, oxigênio e nitrogênio, onde em sua formula estrutural envolve grupos de amina e carboxila e outros ligantes para sua constituição (ISAAC et al., 2011).

Os aminoácidos fazem parte da estrutura proteica, porém os tipos de sequência de aminoácidos e seus ligantes vão diferenciar na formação destas proteínas, fazendo com que, se tenha uma especificidade da função que a mesma venha desempenhar no organismo e meio celular. Os animais diferentemente das plantas não consegue sintetizar/produzir organicamente todos os aminoácidos essenciais para síntese proteica.

Desta forma, as proteínas desempenham funções importantes como constituinte do processo estrutural celular, fisiologia funcional do corpo, transporte de substâncias/moléculas, replicação do DNA. Sendo algumas destas, enzimas catalizadora de reações bioquímicas vitais para manutenção celular e metabolismo dos seres vivos.

Pois quanto tratado sobre as proteínas estruturas que envolver a matriz celular nos deparamos com colágeno, elastina e fibrina, estando presente em grande parte da estrutura funcional da formação do tecido corpóreo (HODDE et al., 2002).

Assim sendo, o colágeno enquanto componente da matriz extracelular (ECM), constitui a massa do microambiente celular natural, podendo ser apontada como um hidrogel de multicomponentes e compostos por proteínas funcionais de proteoglicanos e glicoproteínas servindo para unir ambas as células como exemplo. (CAI; HEILSHORN, 2014).

Para a elaboração de rede da matriz extracelular que denota propriedades únicas, como por exemplo, a alta flexibilidade, a elasticidade, a resistência, a tração, a biodegradabilidade e a biocompatibilidade temos o colágeno como um dos principais componentes responsáveis por estas características acima citadas e formação do tecido conjuntivo nos seres vertebrados (OECHSLE et al., 2014).

3.3.1 Colágeno

Colágeno

Etimologicamente a palavra colágeno deriva do grego cujo Kolla = cola e Geno = produção, tendo sua primeira definição em 1983 no dicionário de Oxford (ALBERTS et al., 1994).

Estudos realizados enquanto ao colágeno dispuseram evidências de que esta proteína contém estrutura regular ao nível molecular, mas somente em 1983 foi melhor entendimento e atribuído a sua definição, sendo este um elemento constitui-te dos tecidos, que quando exposto a aquecimento poderá gerar estrutura gelatinosa por quebra de cadeias moleculares que são sensíveis ao calor (JUNQUEIRA, 2008).

Estando presente nos interstícios de todos os tecidos sendo encontrado em abundância no tecido cartilaginoso, ósseo, vasos sanguíneos, pele, tendões, córnea e órgãos, em menor proporção nos tecidos queratinizados, linfas e sanguíneo.

A denominação de “colágeno” remete a uma família de 27 proteínas isoformas que estão presentes em quantidade significativa no corpo humano, sendo ainda um dos compostos mais abundante do tecido conjuntivo e organismos multicelulares (CAMPBELL, 2000).

3.3.2 Estrutura e composição do colágeno.

Esta proteína está presente desde os invertebrados mais primitivos como exemplo as esponjas até o homem (GONÇALVES et al., 2015). Compõem aproximadamente 25 a 30 % de todas as proteínas no organismo humano, predominando em maior quantidade na pele, tecido ósseo, cartilaginoso e tendões (DUARTE, 2011).

Segundo Prestes 2013, em uma visão geral, o colágeno é composto aproximadamente 30% de glicina, 12% de prolina, 11% de alanina, 10% hidroxiprolina e cerca de 1% remete a hidroxilisina e a pequenos fragmentos de aminoácidos polares. A prolina, alanina e glicina estão no grupo de aminoácidos alifáticos, já a lisina é um aminoácido básico. Podendo ser visto o número de resíduos dos aminoácidos presentes na estrutura colágena na tabela 1.

Esta proteína dispõe uma variedade estrutural supramoleculares, fazendo parte de andaimes mecânicos e suporte natural das células. O colágeno é mais abundante em animais. Segundo Włodarczyk-Biegun e Del-Campo (2017):

“constitui aproximadamente 25% do peso seco do corpo humano. Existem mais de 20 diferentes tipos de colágeno, todos eles com a hélice tripla como motivo de estrutura quaternária. Os colágenos formam diferentes montagens supramoleculares, mas principalmente o colágeno formador de fibrilas tipo I é aplicado no campo dos biomateriais. As fontes mais comuns de colágeno são cauda de rato, pele bovina, tendões e pele de porco. Recentemente, o colágeno (humano) é produzido de forma recombinante ganhou interesse no campo da pesquisa.”

O colágeno consegue distinguir-se de outras proteínas, mediante alta concentração de Glicina – Gly , Prolina – Pro e Hidroxiprolina – Hypro em menor quantidade em sua estrutura primária, sendo comprovada tal menção conforme registro na tabela 1 (GOISSIS, 2007). Sua sequência tripeptídica é frequentemente composta por prolina e hidroxiprolina, diferenciando-se de outras proteínas por elas comumente não apresentarem tais constituintes em outras proteínas, enquanto na proteína colágena constitui mais de 50 % do teor de total de aminoácidos (FERREIRA et al., 2012).

Certa afirmação enquanto ao teor de aminoácidos constituintes da estrutura do colágeno quando somados conforme informação do estudo de Prestes 2013, temos um valor em porcentagem de 64 % de todos os aminoácidos constituintes do colágeno sendo glicina, prolina, hidroxiprolina, alanina e outros constituintes em menos

concentração. Sendo esta informação comprovada conforme registro dos resíduos de aminoácidos que estão na estrutura da triplas-hélice do colágeno I no estudo desenvolvido por FERREIRA et al., 2012, na Tabela 1.

A molécula de colágeno encontra-se em forma de bastão com dimensões de comprimento em torno de 280 nm á 300 nm e 1,5 nm de diâmetro, e massa molecular de 300 kDa, estabilizada por pontes de hidrogênio e ligações intermoleculares. Portanto, a sequência dos aminoácidos que estão no colágeno são na sua grande maioria unidades por tripeptídicas, Glicina - X - prolina, hidroxiprolina – X - glicina, podendo ser X qualquer um dos 20 tipos de aminoácidos padrões, e cada molécula de colágeno poderá ter até três cadeias diferentes que se juntam para compor o procolágeno (GAUZA-WŁODARCZYK; KUBISZ; WŁODARCZYK, 2017; SILVA; PENNA, 2012; FIGUEIREDO, 2015).

A Tabela 1- Número de resíduos de aminoácidos que se encontra presentes na estrutura de tripla-hélice do colágeno tipo 1.

Aminoácidos	Cadeia		Aminoácidos	Cadeia	
	Alfa-1	Alfa-2		Alfa-1	Alfa-2
Estruturais			Hidrofóbicos		
Glicina	345	346	Leucina	9	18
Hidroxiprolina	114	99	Isoleucina	22	33
Prolina	127	108	Metionina	7	4
Básicos			Fenilalanina	13	15
Lisina	34	21	Tirosina	5	4
Arginina	53	56	Valina	17	34
Histidina	3	8			
Hidroxilisina	4	9			
Ácidos/Amidas			Outros/Aminoácidos		
Ácido Aspártico	33	24	Alanina	124	111
Asáparagina	13	23	Treonina	17	20
Ácido Glutâmico	52	46	Serina	37	35
Glutamina	27	24			
Total geral de aminoácidos com cadeia alfa-1				1056	
Total geral de aminoácidos com cadeia alfa-2				1038	

Fonte: (FERREIRA et al., 2012).

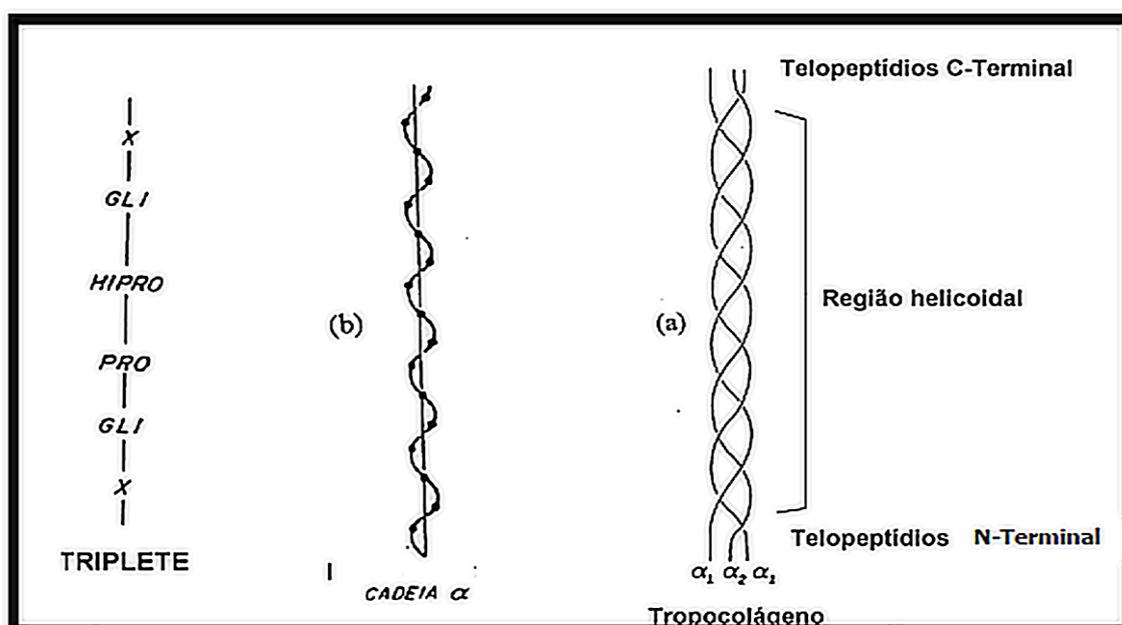
A constituição e formação de cada tipo de colágeno será diferenciado mediante a sequência de aminoácido, estrutura e função que desempenhará, excendo

assim, um papel fundamental para estruturação, formação, estabilidade, integralidade e manutenção dos sistemas e órgãos do corpo humano (LIU et al., 2015; PATI et al., 2012).

Tipicamente, as moléculas de colágeno são longas, com estrutura rígida e forte, tendo três cadeias polipeptídicas que estão retorcidas entre si, uma em volta da outra, recebendo a denominação “cadeias α ” assemelhando-se a uma corda de tripla hélice, como esta ilustrada na figura 1 a combinação dos aminoácidos e processo de forção da triple-helice do colágeno. Sendo esta conformação encontrada em grande parte dos seres vivos, no qual os tipos e organizações destas “cadeias alfa e beta” serão determinados pela formula estrutural do colágeno e função que o mesmo desempenhará em cada órgão ou estrutura específica (FERREIRA, 2013).

Autores ainda definem, como um biopolímero constituído por duas cadeias alfa-1, e uma cadeia alfa-2, tendo uma terceira parte de glicina como menores quantidades de tirosina e histidina conforme ilustrado na figura 1 (MARTÍNEZ-ORTIZ et al., 2015; HUANG et al., 2011; (KITTIPIHATTANABAWON et al., 2005; MUYONGA et al., (2004); SCHRIEBER; GAREIS, 2007)

Figura 01 - Representação das características estruturais da tripla hélice do colágeno e sua formação a partir de suas cadeias alfas



Fonte: (GOISSIS, 2007).

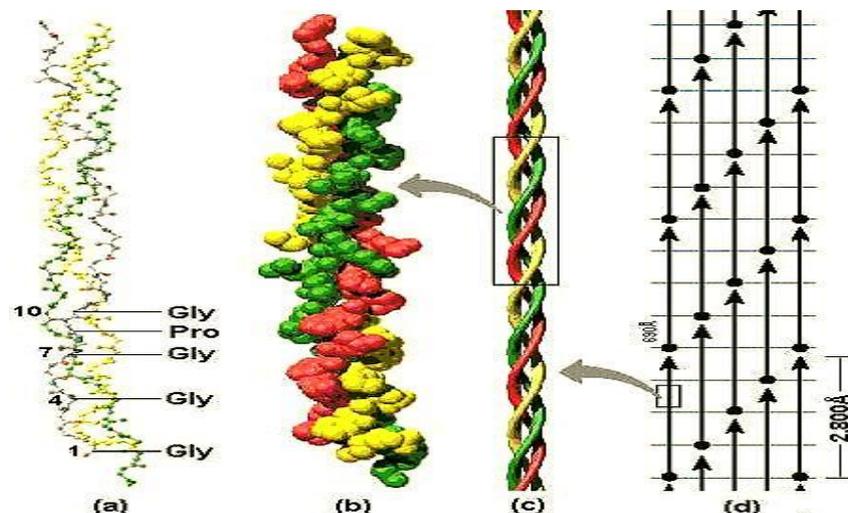
Estima-se que cada polipeptídico apresenta aproximadamente 1038 resíduos de aminoácidos (SENA, 2004). Enquanto na estrutura primária do colágeno tipo I, em uma única cadeia contém 1014 aminoácidos em média, com peso molecular de 10.000 g/mol (MARTÍNEZ-ORTIZ et al., 2015; BRINCKMANN; NOTBOHM; MÜLLER, 2005; CHIEN, 1975; FATHIMA et al., 2004; SINGH et al., 2011).

No qual, a conformação estrutural do colágeno em espiral ou helicoidal é ocasionado principalmente pelos aminoácidos, tirosina, leucina, alanina histidina, metionina, fenilalanina, glutamina e asparagina. Em decorrência do tamanho das cadeias laterais que esta proteína dispõe, a valina e isoleucina não conseguem participar da formação da estrutura estável da alfa-hélice (GAUZA-WŁODARCZYK; KUBISZ; WŁODARCZYK, 2017).

Logo, a estrutura regular da tripe hélice do colágeno sofre ação por parte da serina, treonina que atuam de acordo com as ligações adicionais de hidrogênio que são constituídas pelos grupos de hidroxilo, enquanto que na prolina e glicina favorece com que o átomo de nitrogênio seja acrescentado no anel heterocíclico eliminando assim a possibilidade de rotação da hélice em torno das ligações carbono-nitrogênio, e evitando possível formação de ligações entre hidrogênio intermoleculares que podem causar certa tensão (SHOULDERS; RAINES, 2009).

Como pode ser visto na Figura 2 a combinação dos principais aminoácidos que caracteriza o colágeno, formando ligações específicas que evita formação de rotações improprias, configurando uma deformação e tensão que influenciar diretamente nas qualidades das fibras de colágeno. Caracterizando assim maior participação da prolina e glicina em sua estrutura com objetivo de arrumar a conformação da tripe hélice do colágeno de forma organizada para manter as qualidades e atributos que esta proteína apresenta para ao organismo.

Figura 02 - Estrutura do colágeno. (a) forma da triplete presentes nas matrizes colagênicas; (b) tropocolageno, (c) hélice tripla do colágeno.



Fonte: (SIONKOWSKA, 2006).

Para obter a formação da tripla hélice conforme modelo ilustrativo da Figura 2, é essencial a ocorrência de resíduos de Glicina (GLY) ao longo da cadeia formada na terceira posição um a um, unidade de repetitiva da tríplete GLY – X- Y, na sequência dos aminoácidos, onde os X e Y são geralmente constituídos por Prolina (PRO) e Hidroxiprolina (HYPRO), e, no restante das cadeias, X e Y correspondem a outros tipos de aminoácidos vai diferenciar conforme tipo de colágeno (GONÇALVES et al., 2015; BRODSKY; RAMSHAW, 1997).

Ressaltamos que o colágeno, quando submetido a altas temperaturas e meios ácidos, ficará sucessivo a alterações em sua estrutura sendo ilustrado na figura acima em (A, B e C), podendo ocasionar mudanças em seu contexto físico em favor da fragmentação tridimensionais da hélice tripla sofrida no tropocolageno, tendo a desnaturação e desorganização ou embaraçamento de sua estrutural acarretando em característica gelatinosa (PEDROSO, 2009).

3.3.2 Processo de formação do colágeno

Sabe-se que a produção do colágeno inicia desde o preparo e desenvolvimento do tecido embrionário, estando presente durante o processo inicial de diferenciação dos tecidos, constituindo na base elementar dos tecidos, ósseo, cartilaginosa, pele, vasos sanguíneos e outros órgãos (PEDROSO, 2009)

As células constituintes do tecido conjuntivo, os “fibroblastos”, são de origem mesenquimática, cujas funções incluem a síntese de algumas proteínas dentre estas fibras de colágeno, elastinas, glicoproteínas, glicosaminoglicanas que fazem parte da matriz extracelular. No entanto, quando os fibroblastos estão ativos e amadurecidos, transformam-se em fibroцитos que são responsáveis pela biossíntese do colágeno tipo I (JUNQUEIRA; CARNEIRO; 2013.).

Onde os fibroblastos secretam moléculas de colágenos em forma de procolágeno solúvel, que estão circundadas por duplas estruturas globulares de peptídeos contendo em sua estrutura carbono (C-) e nitrogênio (N-), que contribui com o processo de formação desta proteína e sua conformação (CANTY; KADLER, 2005).

Nesse contexto, o procolágeno solúvel será secretado no interior das vesículas que estão contidas no Aparelho de Golgi, podendo ocorrer armazenamento, empacotamento, remessa e transformação de substâncias que atua em diferentes células e órgãos. Assim, o procolágeno é secretado para a matriz extracelular, depois de inserido na matriz celular, sofre ação de C- e N-peptidases, clivando as suas estruturas globulares que estão interligadas na extremidade do procolágeno.

É por meio das ações destas enzimas que tem-se o início do processo de fibrilogênese, processo este que forma fibrinas finais, que estão contidas nas fibras de colágeno do tecido conjuntivo constituindo um processo de auto montagem e modelação das fibrilas e fibras de colágeno onde tal processo pode ser evidenciado na Figura 3 que ilustra determinadas etapas de formação do colágeno já citadas e processo de constituição das fibras de colágeno.

Logo, as estruturas globulares ligadas ao procolágeno ocupam um grande espaço em volta da molécula, sendo necessário ocorrer a clivagem para dar origem ao tropocolageno, que se ligando ou unindo com outras moléculas de tropocolageno, constitui o processo de formação das fibras e suas características (NEKLYUDOV, 2003).

As moléculas de tropocolageno se ligam umas às outras, lado a lado, ganhando forma de conformação torsa, sendo estabilizado pelas interações hidrofóbicas e eletrostáticas.

Nesse contexto, a interação do grupo de aldeído e grupos aminos livres favorece a união entre dois aminoácidos adjacentes numa mesma molécula por meio de ligações cruzadas covalentes intermoleculares entre as cadeias envolvidas, proporcionando maior estabilidade e força tensora necessária a estrutura supramolecular (FENNEMA; DAMODARAN; PARKIN, 2010).

No início da cadeia do tropocolageno, existem quatro resíduos chaves: dois resíduos de lisina (L), ou hidroxilisina (H) de peptídeos, contendo N- terminal; e dois outros resíduos de lisina (L) ou hidroxilisina (H) contendo C- terminal. Em resumo, podem ser apresentadas constituindo lisina ou hidroxilisina, na fase terminal estando presente C- ou N-. A organização da cabeça–calda–torso da molécula de tropocolageno vai permitir uma interação entre os peptídeos contendo o N- terminal com os peptídeos adjacentes contendo o C-terminal.

O percurso helicoidal desta estrutura voltado para o sentido oposto ao enrolamento das hélices polipeptídicas individuais é levogira, ou seja, encurva-se para a esquerda. Essas conformações permitem um enrolamento das fibras, apertadas umas às outras, tornando possível a constituição de múltiplas cadeias polipeptídicas, podendo ser vista na figura 3 do processo de conformação e estruturação do colágeno.

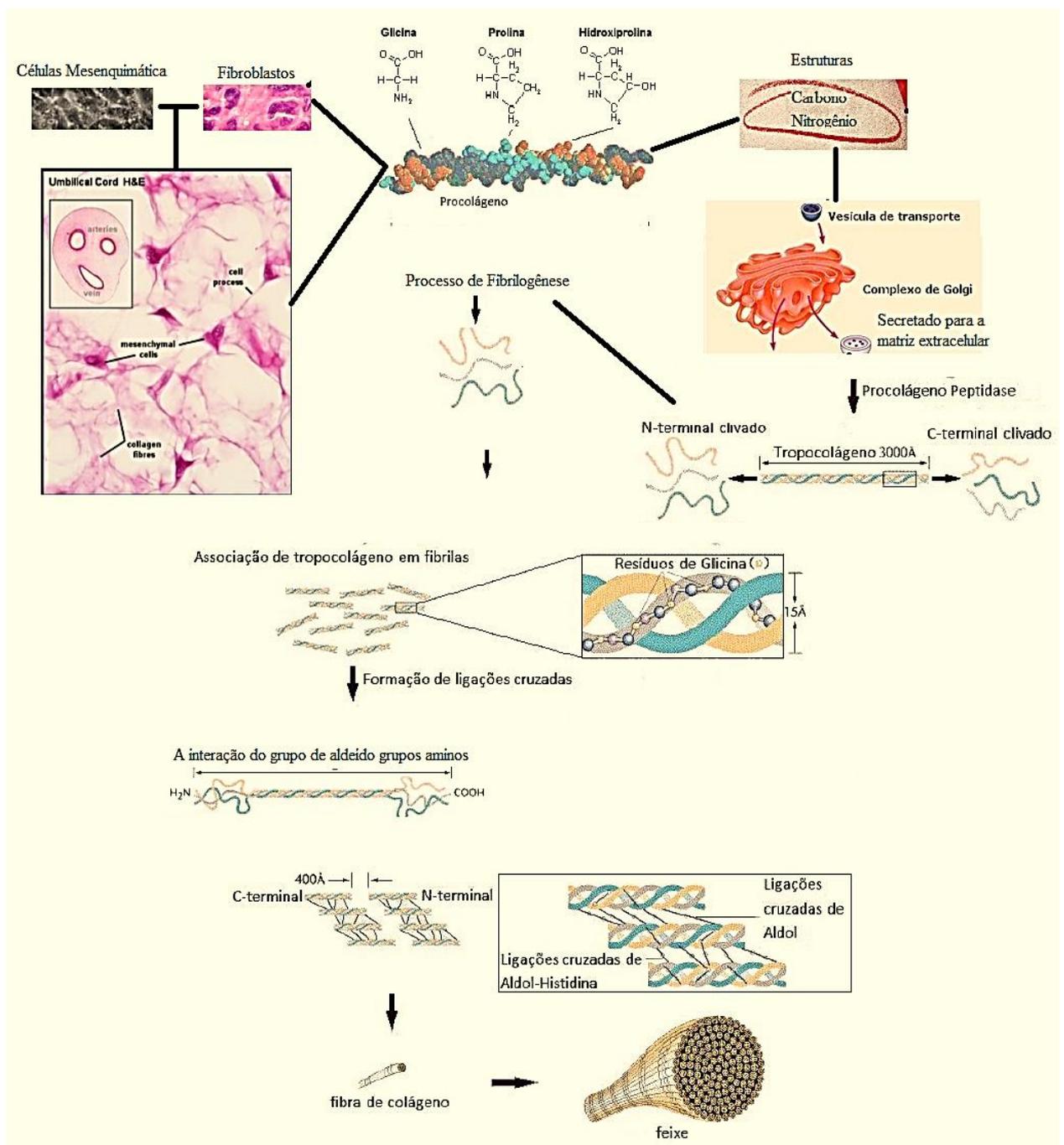
Já o processo de enrolamento da tripla hélice dispõe da força resultante de tensão, onde o colágeno apresenta certa resistência mecânica em favor do enrolamento helicoidal dos múltiplos seguimentos em uma super-hélice, com uma força parecida a cordões enrolados entre si e sobre si mesmos, para formar um cordão mais resistente, constituído a feixe final do processo de formação do colágeno como ilustrado na Figura 3 (FENNEMA; DAMODARAN; PARKIN, 2010).

Os aminoácidos hidroxiprolina e hidroxilisina presentes na estrutura do colágeno não são sintetizados, mas sim constituídos por um processo de hidroxilação da lisina e prolina, iniciando esse processo mediante a tradução de RNAm do colágeno nos ribossomos. Assim, o processo de hidroxilação é concluído após a formação da estrutura linear (SILVA; PENNA, 2012).

As fibrilas fazem parte de um composto que agrega as moléculas de colágeno ao longo de um eixo paralelo, tendo suas extremidades igualmente sobreposta, produzindo bandas de 70 nm. E assim, certa quantidade de fibrila forma as fibras de

colágeno que se organizam em feixes (SILVA; PENNA, 2012; NELSON; COX, 2014; KARSDAL et al., 2016; DAMODARAN et al., 2010).

Na **Figura 3** apresentamos um algoritmo representativo construído pelos autores deste estudo, para melhor entender o processo de formação e constituição da proteína colagenosa mediante informações obtidas em trabalhos de SILVA; PENNA, 2012; NELSON; COX, 2014; KARSDAL et al., 2016; DAMODARAN et al., 2010 dentre outros.



Fonte: Algoritmo elaborado pelos autores desta pesquisa

3.3.4 Tipos de colágeno

Segundo Duarte (2011), tais tipos de colágeno poderão apresentar diferença no diâmetro, composição/cadeia de aminoácidos, estrutura molecular, comprimento, local onde é encontrado e concentração. Estudos referem à existência de 28 tipos de colágeno, sendo estes reconhecidos em vários tecidos.

O **colágeno tipo I** é o mais comum e abundante, apresentado com forma fibrilar, e é um dos mais investigados, constituindo-se um dos compostos estruturais-chave de vários tecidos. Estando expressivamente no tecido conjuntivo e em componentes preponderantes da membrana intersticial, de tendões, da derme da pele, de ossos e córneas (LIU et al., 2012). Possíveis mutações ou danos cometidos a tal proteína pode conduzir o surgimento de uma série de patologias, com certo foco nas doenças de tecido ósseo e conjuntivo, como Osteogênese Imperfeita e Síndrome de Ehlers Danlos – SED. O quadro clínico inclui dores, dificuldade de manter a postura e a estabilidade, ocasionando possíveis limitações e aparecimento de lesões (KARSDAL et al., 2016).

O **colágeno tipo II** apresenta características semelhantes com o tipo I, onde as fibrilas do tipo II dão origem a uma rede tridimensional mais fina em seu diâmetro, contendo alto teor de hidroxiprolina e hidroxilisina (maior do que colágeno do tipo I). Têm, ainda, pequena quantidade de fibrilas de outros tipos de colágeno IX e XI com síntese nos condroblastos (KUZAN et al., 2017).

Está presente na cartilagem hialina, humor vítreo, discos intervertebrais, cartilagem elástica e região ocular, na qual sua presença tem sido relatada nas paredes de artérias. Porém, estudos *in vitro* e *in vivo* não apresentaram uma explicação bem definida do porquê esta proteína apresenta-se em locais tão incomuns e diferentes (KUZAN et al., 2017).

O tipo II dispõe uma força e estabilidade aos tecidos que se encontra presente, com integridade e resiliência ao estresse, pois sua clivagem é mediada pela colagenases da família da metaloproteinase de matriz, resultando em biomarcadores como o tetrapéptido C-terminal de colágeno tipo II, o que torna um importante elemento/parceiro de ligações, como da fibronectina e outros tipos de colágenos (KARSDAL et al., 2016).

O **Colágeno tipo III** caracteriza-se por ter fibras retas, longas e finas com periodicidade de aproximadamente 60 nm, resultando em um tecido mais compatível e amplamente distribuído como componente da matriz extracelular, bem como é secretado por fibroblastos e outros tipos de células mesenquimais (COHEN, 2012).

Consistindo apenas com uma cadeia alfa de colágeno, está em contato com a maioria dos outros colágenos. É um homotrímero, ou seja, formado por três cadeias alfas 1 (III) totalmente idênticas que estão bem entrelaçadas em torno de uma tripa hélice. Onde, em conjunto com o colágeno tipo I, são os constituintes principais da matriz intersticial que compõem o tecido conjuntivo frouxo (KARSDAL et al., 2016).

O mesmo pode ser encontrado nos músculos e estruturas do intestino, fígado, artéria aorta do coração, útero e pulmões, constituindo as fibras reticulares, servindo para ligar o tecido conjuntivo aos tecidos adjacentes, formando um traçado de fibras firme, estando em certa abundância em órgãos que apresentam maior relação com o sangue (GONÇALVES et al., 2015).

O **colágeno tipo IV** é identificado como o primeiro colágeno não formador de fibras, compreendendo cerca de 50% dos componentes da membrana basal, onde o liga-se às células por meio de integrinas, que são proteínas de adesão presentes na membrana celular na forma transmembrânica, na superfície celular ou por meio de receptores de domínio da discoidina que reconhece diferentes ligantes com funções biológicas distintas. Desse modo, interação deste tipo de colágeno é importante para manter um bom funcionamento das células endoteliais que tem a função de recobrir o interior dos vasos sanguíneos e capilares, formando certa estrutura de suas paredes. (MCLEOD et al., 2014).

Atua fornecendo um suporte estrutural regulador no que envolve a adesão, migração e sobrevivência das células, distinguindo-se de outros tipos de colágeno por ter suas cadeias polipeptídicas de col-IV humanas codificadas por seis genes diferentes, sendo estes: COL4A1, COL4A2, COL4A3, COL4A4, COL4A5 e COL4A6, estando presente com maior concentração na lamina basal e nos rins (OEFNER et al., 2015).

O **colágeno tipo V** é do tipo fibrilar, sendo essencial para a fibrilação do colágeno I e III, estando envolvido no desenvolvimento e qualidade dos tecidos em que encontra-se inserido. Além disso, a formação e degradação do colágeno tipo V é um dos biomarcadores que concebe interrelação com patologias que envolve o tecido conjuntivo (KARSDAL, 2016).

Portanto, as propriedades fisiológicas e mecânicas da pele dependem da montagem correta da matriz dérmica, e, especialmente, dos colágenos constituintes dominantes, embora os colágenos de formação das fibrilas I e III representa a maior proporção, temos o colágeno tipo V que desempenha um papel importante na formação e montagem da matriz de colágeno dérmico, no qual, este regula a montagem adequada

das fibrilas dos colágenos tipos I e III. Então, quando presente algum distúrbio genético no colágeno V, são apresentados alguns problemas, como: síndrome de Ehlers-Danlos, pele frágil e hiperextensível (BRADLEY, 2017).

Recentemente, as moléculas deste tipo de colágeno são relatadas em vários tipos de tecidos e órgãos no estágio inicial, como córneas, pele, tendões e ossos, sendo o mesmo isolado e reconstituído a parti de placenta humana. Estando associado com o colágeno tipo I, estando presente nos locais que requer grande resistência (HSU et al., 2013).

O **colágeno tipo VI** é do tipo não fibrilar sendo, expresso em muitos tecidos conjuntivos e estando envolvido na organização da matriz, interagindo com uma expressiva quantidade de componentes da matriz extracelular, no qual forma uma certa malha filamentosa altamente ramificada circundando os principais tipos de colágeno.

Por meio da interação com o tipo de colágeno IV nas membranas basais, ancora os vasos sanguíneos, células mesenquimais e nervos, servindo ainda como repositório, para o fator de crescimento e derivados das plaquetas (THEOCHARIDIS et al., 2016).

Além disso, o mesmo pode atuar como sensor inicial de resposta de lesões/reparo, podendo regular a fibrogênese pela modulação da célula-célula, estimulando a proliferação das células mesenquimais e prevenindo a apoptose. Quando envolvido em mutações, ocorrem certos distúrbios de fraqueza muscular, como a miopatia Bethlem, uma distrofia muscular de progressão lenta e outras distrofias musculares (KARSDAL et al., 2016).

O **colágeno tipo VII** é um dos principais componentes que ancora a fibrilas conectando a lamina basal e derme, sendo sintetizado por queratinócitos e fibroblastos constituindo um elemento essencial para estabilidade e função da matriz extracelular (ECM). Ele se liga ao colágeno I e III proporcionando uma estabilidade a membrana intersticial e ECM (KARSDAL et al., 2016).

Consequentemente, a perda de sua função acarreta aparecimento de bolhas na pele, mais conhecida como epidermólise bolhosa distrófica, devido a mutações ocorridas no gene deste tipo de colágeno VII. Tal patologia é auto-imune, pois a proteína é reconhecida como autoantígeno, devido a problemas nesse tipo de colágeno. O colágeno VII é encontrado em boa parte das junções dermo-epitelial e nas células corioamnióticas (WINDLER et al., 2017).

O **colágeno tipo VIII** apresenta uma cadeia curta, do tipo não fibrilante formada pelas células endoteliais e constitui-se como o principal componente da membrana de Descemet, que é uma das seis camadas do olho, conferida por elasticidade, facilmente regenerativa com espessura que varia sua dimensão ao longo da vida em torno de 2 a 10 mm nas diferentes camadas oculares (KARSDAL et al., 2016).

Estudos adicionais apontaram hipoteticamente que esta proteína nos olhos e rins desempenha função de regular a resposta migratória e proliferativa em uma variedade de células, mas pouco se sabe sobre este mecanismo no qual o colágeno VIII é encontrado. Bem como o controle da migração celular por propriedades sinalizadoras (ADIGUZEL et al., 2013).

Esta proteína é encontrada no coração, cérebro, fígado, pulmão, músculos e ao redor dos condrócitos na cartilagem, bem como em torno dos vasos, pertencendo assim algumas células endoteliais (KARSDAL et al., 2016).

O **colágeno tipo IX** foi o primeiro a ser descrito como uma proteoglicana, tendo como base uma proteína central ligada a vários glicosaminoglicanos (GAG), sendo heterotrimérica, formada por três polipeptídeos distintos, correspondendo ao complexo transdutor de sinais que está localizado no interior das fibrilas de colágeno II e XI, implicando também uma função de regulação do diâmetro das fibrilas de colágeno (KRUG et al., 2013).

É encontrado nas articulações adultas, condrócitos das cartilagens da placa de crescimento e nos discos intervertebrais. Contribui assim, para manter a estabilização da rede de colágeno fibrilar na matriz, mantendo as células unidas dando-lhes resistência à pressão (KARSDAL et al., 2016).

O **colágeno do tipo X** é formador de rede, tendo uma hélice tripla de 463 aminoácidos, sendo sintetizado por condrócitos hipertróficos na cartilagem de crescimento, destinada a ser calcificada, no qual pesquisadores suspeitam que o colágeno possa facilitar o processo de calcificação óssea (KARSDAL et al., 2016; SHEN et al., 2006).

O **colágeno do tipo XI** também é heterotrimérico, o qual polimeriza para constituir o núcleo das fibras de colágeno do tipo I e II, regulando o diâmetro das cartilagens e mantendo forte a interação com o colágeno tipo II (MCALINDEN et al., 2014).

Portanto, este é amplamente difundido nos músculos esqueléticos, placenta, testículos, osso trabecular, traqueia, cartilagem articular, tendões, pulmões, discos intervertebrais e neopitelio do cérebro (MCALINDEN et al., 2014).

O **colágeno do tipo XII** está contido em um subgrupo de fibrilas com hélices triplas interrompidas, nas quais estão incluídos os colágenos do tipo IX, XIV, XIX, XX, XXI e XXII. Além disso, este é um dos componentes do músculo esquelético humano, tornando o tecido mais espesso e caracterizando-se pela orientação de fibrilas mais organizadas. Pesquisadores trabalham com a hipótese que este tipo de colágeno pode ter atribuição de organizar a arquitetura da matriz extracelular e na cicatrização dos ligamentos periodontais (TSUZUKI et al., 2016).

Contendo em maior proporção em estruturas que são submetidas a alta tensões, como nos tendões e ligamentos, onde tal colágeno e seus parceiros de ligação podem formar pontes flexíveis entre as fibrilas de colágeno vizinhas, agindo para absorver tensões e estresse (CHIQUEL et al., 2014).

O **colágeno do tipo XIII** é amplamente expresso em tecidos mesenquimatosos, sendo este um tecido embrionário derivado da mesoderme, no qual, durante a sua fase de transformação, dá origem a um tipo de tecido conjuntivo primitivo denominado de mesênquima. Estando acentuada sua presença durante o desenvolvimento e crescimento pós-natal, ocorre sua diminuição na trajetória da idade adulta, e expresso nas células de produção do tecido conjuntivo. No entanto, este tipo de colágeno se liga a várias proteínas, como fibronectina, vitronectina, perlecano, colágeno tipo IV e perlecano (HEIKKINEN; TU; PIHLAJANIEMI, 2012).

O mesmo pode estar fortemente associado ao colágeno tipo I e III, constituindo-se praticamente em todos os tecidos estudados, na cicatrização de feridas da córnea e fibrose renal, em vasos sanguíneos, estruturas juncionais a exemplo, junções miotendinosa (JMT) e neuromusculares, dentre outros (HEIKKINEN; TU; PIHLAJANIEMI, 2012).

O **colágeno do tipo XIV** apresenta-se em áreas submetidas a alto estresse mecânico, o que deixa indício de ter potencial na manutenção dos tecidos mecânicos, sugerindo assim a sua importância para a montagem da ECM e desenvolvimento das funções dos tecidos, tendões e na pele. Assim, é explícito que este colágeno mantém o estabelecimento do interstício cardíaco para o desenvolvimento do músculo miocárdico, além de regular o crescimento dos cardiomiócitos, que são as fibras do músculo cardíaco, e a existência de fibroblastos cardíacos (TAO et al., 2012).

O **colágeno do tipo XV** é bastante homólogo ao XVIII, decorrendo dos fibroblastos, células musculares e endoteliais estando predominantemente localizado nas zonas da membrana basal dos microvasos, miócitos cardíacos ou esqueléticos (PAGNON-MINOT et al., 2008).

O **colágeno do tipo XVI** apresenta sequência de codificação proteica que compreende cerca de 1604 aminoácidos e peso molecular de 210 kDa para cada cadeia alfa 1 nativa, com hélice tripla interrompida que não forma fibrilas, mas consegue associar-se aos colágenos formadores de fibrilas como molécula única. O mesmo é sintetizado por vários tipos de células, dentre estas, fibroblastos dérmicos e dendrócitos, condrócitos, cartilagem e queratinócitos e células musculares lisas (GRÄSSEL; BAUER, 2013).

Apresenta como função, também, organizar e estabilizar a matriz extracelular por meio da estabilização de fibrilas de colágeno e ancoragem de microfibrila na membrana basal, ajudando a permear a sinalização intracelular. Está em alguns tipos de tecidos como a pele, rins, parede arterial, cartilagem, coração e intestino (KARSDAL et al., 2016).

O **colágeno do tipo XVII** é uma glicoproteína transmembranar de tipo II, onde é conhecido por ser um componente estrutural da hemidesmossomas, tendo como função estabilizar a adesão das células epiteliais a matriz extracelular circulante, ou seja, aderir as células epiteliais a derme subjacente. Possíveis mutações sofridas em tal proteína acarretam doenças de distrofia da epiderme que esta susceptível a erosões, “bolhas e lesões”, recebendo a denominação de penfigóide bolhosa, a falta ou perda de sua função da proteína colágena acarreta no aparecimento do problema acima citado (NISHIE et al., 2015).

Esta proteína encontra-se em maior concentração nas junções dermo-epidermal, podendo correlacionar ao processo de ancoragem dos neurônios e seu substrato, bem como, no desenvolvimento na migração neuronal durante a morfogênese sendo um estabilizador sináptico do Sistema Nervoso Central (SNC), segundo hipóteses de alguns estudos (SEPPÄNEN et al., 2007).

O **colágeno do tipo XVIII** constitui uma das proteínas da membrana basal, instituída como um inibidor do processo de angiogênese e do crescimento tumoral. É conhecido cerca de três isoformas que o mesmo pode apresentar-se, na forma curta, esta presente nas estruturas da membrana basal vascularizada e epitelial, a longa é evidente no fígado e tecido adiposo (SEPPINEN; PIHLAJANIEMI, 2011).

Este tipo de colágeno é encontrado em tecidos com alto índice de vascularização, e durante o seu desenvolvimento tecidual como, nos rins, epitélio pulmonar, núcleo do tecido conjuntivo, das almofadas endocardiais e folhetos das valvulas atrioventriculares durante o seu desenvolvimento e nos olhos (SEPPINEN; PIHLAJANIEMI, 2011).

O **colágeno do tipo XIX** foi descoberto em 1992 por Yoshioka et al, constituindo a família dos colágenos associados a fibrina com helice tripla interrompida (FACIT), estando menos associado na zona da membrana basal. Não estão muito bem estabelecidas e determinadas as funções desta proteína, mas estudos apontam de sua importância nos estágios iniciais na diferenciação muscular, estando fortemente envolvida nas funções do esfíncter do estômago e seu desenvolvimento muscular, o que concluiu um estudo realizado com ratos (OUDART et al., 2017).

Acredita-se que sua participação na formação da sinapse inibitória promove o modo de montagem das terminações nervosas inibitórias, por meio dos receptores de integrina. Contudo, este tipo de colágeno é bem explícito no baço, rins, pele, próstata, zona da membrana basal vascular, mesenquimal, neuronal, mama, colon, fígado e placenta dentre outros. (SUN et al., 2017).

O **colágeno do tipo XX** apresenta certa semelhança com o colágeno do tipo VII e XIV. Quando tratado sobre a sua função é relativamente desconhecida, sendo importante realizar estudos que vise entender, investigar e quantificar o papel biológico do mesmo no organismo humano (KARSDAL et al., 2016).

O **colágeno do tipo XXI** pode se polimerizar, tendo uma mistura de dois ou mais monômeros na polimerização para da origem ao copolímero, por meio de seus domínios colágenos C-terminais e mediação da interação de proteína-proteína não colágenos N-terminais, servindo como elementos constituintes para as pontes moleculares da matriz (KARSDAL et al., 2016).

Assemelha-se a família dos colágenos FACIT, pertencendo aos componentes da matriz extracelular das paredes dos vasos sanguíneos, secretado por meio das células da musculatura lisa, nos quais leva a acreditar que possa exercer função na montagem da rede vascular durante o período de formação dos vasos sanguíneos. Sua presença é manifestada na placenta, jejuno, pâncreas, nódulos linfáticos, coração, rins, pulmão, estômago e músculo esquelético (KARSDAL et al., 2016).

O **colágeno do tipo XXII** predomina-se no músculo esquelético do ser humano e coração, e, em menor concentração, em pele, estruturas cartilaginosas e junções miotendíneas (MTJs), que reflete no sítio de transmissão da força muscular aos tendões, atuando no posicionamento e estabilidade articular. Pois tal deficiência desta proteína, desencadeia distrofia muscular, perda de força e estabilidade (KARSDAL et al., 2016).

O **colágeno do tipo XXIII** é do tipo transmembrana sendo um componente de alguns epitélios que remete influenciar na formação, manutenção ou polarização das células epiteliais, mas, quando trata-se de sua função, não é bem sucinta. Pesquisa descreve o aparecimento desta proteína em unhas de pacientes que apresentava câncer de próstata e pulmão, indicando um fator potencial de biomarcador de progressão destas patologias, podendo ser uma possível e nova ferramenta que ajude ao diagnóstico de alguns tipos de câncer (KARSDAL et al., 2016).

O **colágeno do tipo XXIV** encontra-se na forma fibrilar, estando predominantemente na estrutura do osso, cérebro, baço, testículos, ovários e rins, tendo o seu aumento em quadro de carcinomas, células escamosas da cabeça e pescoço, sendo capaz de indicar uma diferenciação de osteoblastos em certos tipos de câncer (KARSDAL et al., 2016).

O **colágeno do tipo XXV** acha-se nos neurônios do cérebro em maior quantidade, contudo acredita-se que a ocorrência de clivagem desta proteína pode estar associada ao aparecimento da doença de Alzheimer por meio de algumas provas genéticas e testes realizados, que sugerem a ocorrência de problemas durante a sinapse (KARSDAL et al., 2016).

3.3.5 Algumas formas em que o colágeno é encontrado e comercializado.

Sabemos que o colágeno produzido sinteticamente é derivado de fontes animais, dentre as quais se destacam os bovinos e os suínos. Contudo, o colágeno derivado de animais aquáticos podem constituir uma nova fonte de extração com perspectiva promissora de boa qualidade, fácil obtenção, alta quantidade de fibras colagenosas nativas, risco de contaminação e transmissão de patologias baixo quando observado a principal fonte extraída na atualidade (BENEDETTO et al., 2014).

A comercialização do colágeno é comum na forma hidrolisada, apresentada no contexto comercial em cápsula ou em pó. Tendo em vista que o processo de extração ocasiona uma quebra da longa cadeia de aminoácidos, há absorção de molécula de água. Por meio desta característica ou forma de representação reduz significativamente o desempenho mecânico do mesmo na membrana, podendo ocorrer limitação em certas áreas biomedicas devido às condições e finalidade de aplicação de tal produto (KEW et al., 2011).

Outra forma encontrada é “cultura de gel de colágeno (CGC)”, sendo esta descrita por Dey e desenvolvida por Bell, um ensaio cujo objetivo era sintetizar com sucesso um possível tecido vivo, constituindo-se a derme, “*dermis equivalent*” *in vitro*, tendo êxito em sua pesquisa. Desde então, tal estudo e técnica desenvolvida de (CGC) foi utilizada e aplicada a uma ampla variedade de tecidos, como fígado, ossos, cartilagem e tendões (SAITO et al., 2017).

Porém, o colágeno em forma de gel pode ser encontrado em alguns produtos com finalidade estética, podendo ser aplicado de forma tópica “sobre a pele”, para formar máscaras, ou cremes a base de geis com propósito de redução de rugas, revitalização da pele, hidratação e carreadores de substâncias para derme e seus tecidos adjacentes.

Todavia, na forma de hidrogel, o colágeno é utilizado como um dos principais constituintes de escudo da córnea. Assim como, certos estudos investigativos em favor de sua aplicação injetável, em específico nos ventrículos após infarto do miocárdio, para ter a estabilização e melhoramento da remodelação ventricular que foi acometida por tal infarto, mostrou em seus resultados boas expectativas (HASAN et al., 2015).

Outra forma apresentada é gelatina de colágeno derivada da hidrólise “quebra” parcial do colágeno, sendo bastante rica em material colagenoso e comercializada como um produto alimentício de fácil digestão que contém boa parte dos aminoácidos essenciais, auxiliando o funcionamento do organismo e melhorando o seu equilíbrio homeostático (PRESTES, 2013).

Sendo ainda, é um dos produtos alimentares de proteína pura gerada pela desnaturação do colágeno, na qual é utilizada como alimento dietético altamente digestível. Contudo, o consumo de gelatina, tem aumentado anualmente no mundo inteiro, tendo a sua produção anual em torno de 32.6000 toneladas, no qual destas 46 % foi proveniente de pele suína, 29,4 % do couro bovino, 23,1 % de ossos e 1,5 % de outras fontes ou partes (TAVAKOLIPOUR, 2011).

Encontramos o colágeno na forma de esponja, tem certa finalidade de promover o processo de homeostasia do local aplicado, contribuindo significativamente no modo de cicatrização das lesões, devido a características que tal material dispõe no processo de absorção de exudato dos tecidos, mantendo uma boa permeabilidade e troca de gases, bem como umidade no interior da lesão, o que auxilia a formação do tecido de granulação e regeneração quando utilizado de forma correta (SUN et al., 2017).

Estes tipos de esponjas conseguem dispôr um controle rápido de hemorragia, como também a capacidade de retenção/absorção de água, detendo em sua superfície a aderência de plaquetas, promovendo a coagulação e evitando perdas sanguíneas. Contêm, ainda, biocompatibilidade e degradabilidade, o que torna viável a sua utilização no tratamento pós-operatório, com potencial promissor de aplicabilidade na área clínica/médica (YAN et al., 2017).

Entretanto, a utilização do colágeno também está associada na produção de enxerto/implantes odontológicos, cujo objetivo é proporcionar a regeneração nervosa, ossos, cartilagem, cornea, tendões, enxertos vasculares e ligamentos. Estudos com influência da química, física e outras áreas, têm conseguido favorecer resultados positivos no que tarta o desenvolvimento de andaimes, filmes e outros produtos a base de colágeno (BONFRATE et al., 2017).

Em muitos casos, a população não sabe ao certo o que é colágeno, como o mesmo é produzido; a sua importância para organismo e funcionalidade. Mas desperta o

interesse de muitos a sua utilização, por acreditarem nos benefícios estéticos, auxiliando no combate ao envelhecimento celular e prevenção de algumas doenças.

3.3.6 Utilização do colágeno para o tratamento de lesões

A pele ou tecido cutâneo é considerado o maior órgão do corpo humano, apresentando várias funções, sendo elas: proteção, sensação, regulação térmica, absorção, excreção e armazenamento. (SILVA et al., 2009).

É visto que, na maioria dos acidentes ocorridos, o primeiro órgão a ser atingido e lesionado é a pele, porém, no serviço público e privado existem poucas unidades especializadas que visem o tratamento destas lesões dos mais diferentes tipos com eficiência e eficácia em curto intervalo de tempo.

Em alguns casos, pacientes portadores de lesões “feridas” são tratados e vistos como aberrações, resultando em sentimento de negatividade, exclusão, estresse, depressão e isolados em favor das características que a lesão dispõe no que trata odor, exsudato e disforme tissular. O certo é que esse paciente receba um tratamento de qualidade em busca da promoção e recuperação destas lesões, que refletirá diretamente na sua inclusão no meio social, (MORAIS; OLIVEIRA; SOARES; 2008).

Lembramos que existe mais de 110 milhões de incisões cirúrgicas por ano, enquanto feridas traumáticas 1,5 milhões de novos casos ao ano. (MCDERMOTT-SCALES; COWMAN; GETHIN, 2009). As úlceras por pressão têm um quadro de incidência aproximadamente de 8,5 milhões no mundo, já a úlcera venosa representa 12,5 milhões, e lesões diabéticas com 13,5 milhões de novos casos ao ano (LAWALL, 2012).

Em favor do elevado número de pessoas acometidas por lesões cutâneas, tem-se um problema de saúde pública que acarreta impactos sociais, culturais e espirituais em sua rotina. Os produtos para o tratamento das feridas em muitas vezes são de difícil acesso pelo valor aquisitivo (GOMES, 2011).

Com base em observações feitas, identificamos que existem altos índices de pessoas portadores de lesões cutâneas, muito das quais dispõe caráter crônico, o que

desencadeia maior custo financeiro para sua recuperação, por parte das instituições e pacientes, que em muito dos casos não se tem sua recuperação/cicatrização.

Holmes et al. (2013) trabalhou com feridas onde o seu processo de cicatrização encontrava estático “parado”, apresentando mau odor, ausência do tecido de granulação “formação de novo tecido”, aumento do processo de exsudato e degeneração dos tecidos ao redor da lesão.

O mesmo realizou um estudo comparativo antes e depois destas lesões, quando tratadas com curativos que continham colágeno em sua composição. Em seu estudo, comprovou em poucos dias uma possível ativação da cascata de cicatrização destas lesões, resultando no aumento do tecido de granulação, redução do tamanho do leito da ferida de diferentes tipos de lesões, como feridas diabéticas crônicas e úlceras de forma significativa (HOLMES et al., 2013).

A utilização do colágeno em tratamento de feridas é fundamental por estar presente em grande quantidade no tecido conjuntivo e por todas as características que configura no processo de cicatrização e corpo humano, conforme descrito em algumas literaturas como exemplo em livros de estomaterapia e artigos.

Um estudo desenvolvido por Rodrigues (2009), onde o mesmo analisou os efeitos proliferativos e de biossíntese do colágeno, quando aplicados em fibroblastos humanos de derme normal. Os resultados evidenciaram que o colágeno possivelmente induziu as propriedades adesivas nos fibroblastos não ocasionando intoxicação.

A utilização do colágeno sobre a superfície da derme demonstrou resultados eficazes quando utilizado com *Aloe vera* no tratamento de feridas isquêmicas, e não ocasionando nem um tipo de incômodo, desconforto ou complicação nos grupos de pacientes estudados. O tempo de cicatrização das lesões foi menor para o grupo que aplicou o colágeno com *Aloe vera*, quando comparado com os grupos estudados (OLIVEIRA; SOARES; ROCHA, 2010).

Um grupo de pesquisadores desenvolveu um hidrogel denominado de BC-COL onde em sua composição continha colágeno. Foram realizados vários testes de aplicação em lesões criadas em ratos, como, também, um estudo comparativo com um produto denominado de Colagenase. O resultado da pesquisa demonstram que o produto BC-COL mostrou ser um potencial curativo de lesões de pele, sendo ação do mesmo

mais satisfatório quando coparado com a pomada de Colagenase (MORAIS; OLIVEIRA; SOARES, 2008).

Os biomaterias criados a partir do colágeno representam alternativas terapêuticas na área medica e odontológica, tendo biocompatibilidade de promover e ajudar no processo de cicatrização de feridas, diminuindo o tempo de internação e os gastos hospitalares de pessoas acometidas por este problema. (SILVA et al., 2009).

4. MATERIAI E MÉTODOS

METODOLOGIA

4.1 Tipo de estudo

Esse estudo configura-se a partir de um enfoque qualitativo por investigar se o colágeno que será extraído dispõe de elementos estruturais com boa aplicabilidade e utilização, quando comparado com outros colágenos já comercializados.

Tendo abordagem quantitativa, fazendo uso de fórmulas básicas de matemáticas e estatística, para comprovar a viabilidade do processo extrativo da matéria-prima a base de colágeno provindo de *Gallus Gallus domesticus*.

4.2 Local do estudo

Esta pesquisa foi desenvolvida no laboratório de química orgânica da Universidade da Integração Internacional da Lusofonia Afro-Brasileira, localizada em Redenção - Ce, “UNILAB” e Universidade Federal do Ceará – UFC, em específico laboratório de Farmacologia no campo Rodolfo Teófilo e Laboratório de Polímeros campus do Pici.

4.3 Matéria-prima de Estudo/ Amostras.

Inicialmente, a matéria-prima para extração de possível colágeno foi por meio dos pés de *Gallus gallus domesticus* da família das Fasianídeas, de origem asiática, popularmente conhecido como frango de granja e frango de corte.

As amostras foram providas de abatedouro que comercializa carne avícola, tendo como rejeito os pés de *gallus domesticus*, pele, pescoço, costela. A aquisição da matéria prima deu-se mediante compra direta com o abatedouro/frigorífico e, em alguns momentos, sendo doadas. O valor de compra foi em torno de R\$ 3,50 (três reais e cinquenta centavos) por quilograma (Kg), podendo tal valor variar conforme localidade e local de comercialização.

Ademais, outras unidades produtoras avícolas na grande maioria acabam desprezando os pés de *gallus domesticus* juntamente com suas vísceras e penas, criando

certa dificuldade para encontrar, sendo então, mais viável a aquisição dos mesmos mediante encomenda em alguns casos.

A escolha das amostras, por sua vez, foi realizada a partir da aplicação de critérios de inclusão e exclusão. O critério de inclusão para a escolha dos pés foram aqueles que não apresentavam aspecto e características com mal odor, meio escurecido, com proliferação de microrganismo, sendo escolhido aqueles que apresentava bom estado de conservação.

O critério de exclusão foram descartados os pés de *gallus domesticus* que apresentava mal odor, cianose, estado de conservação ruim, grande tempo de abate, com presença de lesões e presença de calos e edemas.

4.4. Amostra do colágeno padrão

Conforme não encontrado matéria-prima de colágeno provido de aves, assim como, caracterizado e comercializado para utilizar como matéria-prima padrão. Optou-se em utilizar o colágeno hidrolisado de origem bovina, provido de farmácias de manipulações, por conhecer suas propriedades e componentes conforme registro em ficha técnica.

5.1 Extração do colágeno a partir de resíduos da indústria avícola

Inicialmente, o processo de extração do colágeno de *Gallus gallus domesticus* foi realizado mediante algumas adaptações em busca de comparar e desenvolver um método de extração eficiente e específico para tal matéria prima.

Desta forma, nos tópicos seguintes apresentaremos três métodos utilizados para extrair possível material colagenoso. O primeiro método utilizado foi baseado no processo de extração de colágeno de origem bovina proposto por Liu (2010), com algumas adaptações.

O processo de obtenção do colágeno foi realizado a partir dos rejeitos (pés) de *Gallus gallus domesticus* provindos de frigoríficos e abatedouros de aves, em que cerca de duzentos gramas (200g) de pés de frango, sem as unhas, cortados em proporções de 2 cm x 2 cm, e lavados em água corrente para retirada de resíduos sanguinolento e excesso de possíveis sujeiras e gorduras. Feita a lavagem do material, retiramos a maior quantidade de água com papel toalha. Em um Erlenmeyer de 250 ml colocamos as amostras em contato com solução de NaOH 0,1 Mol, sendo encaminhado para agitador orbital, permanecendo por um período de 72 horas, sendo observado determinadas etapas descritas pelo método de Liu (2010) em figura 05.

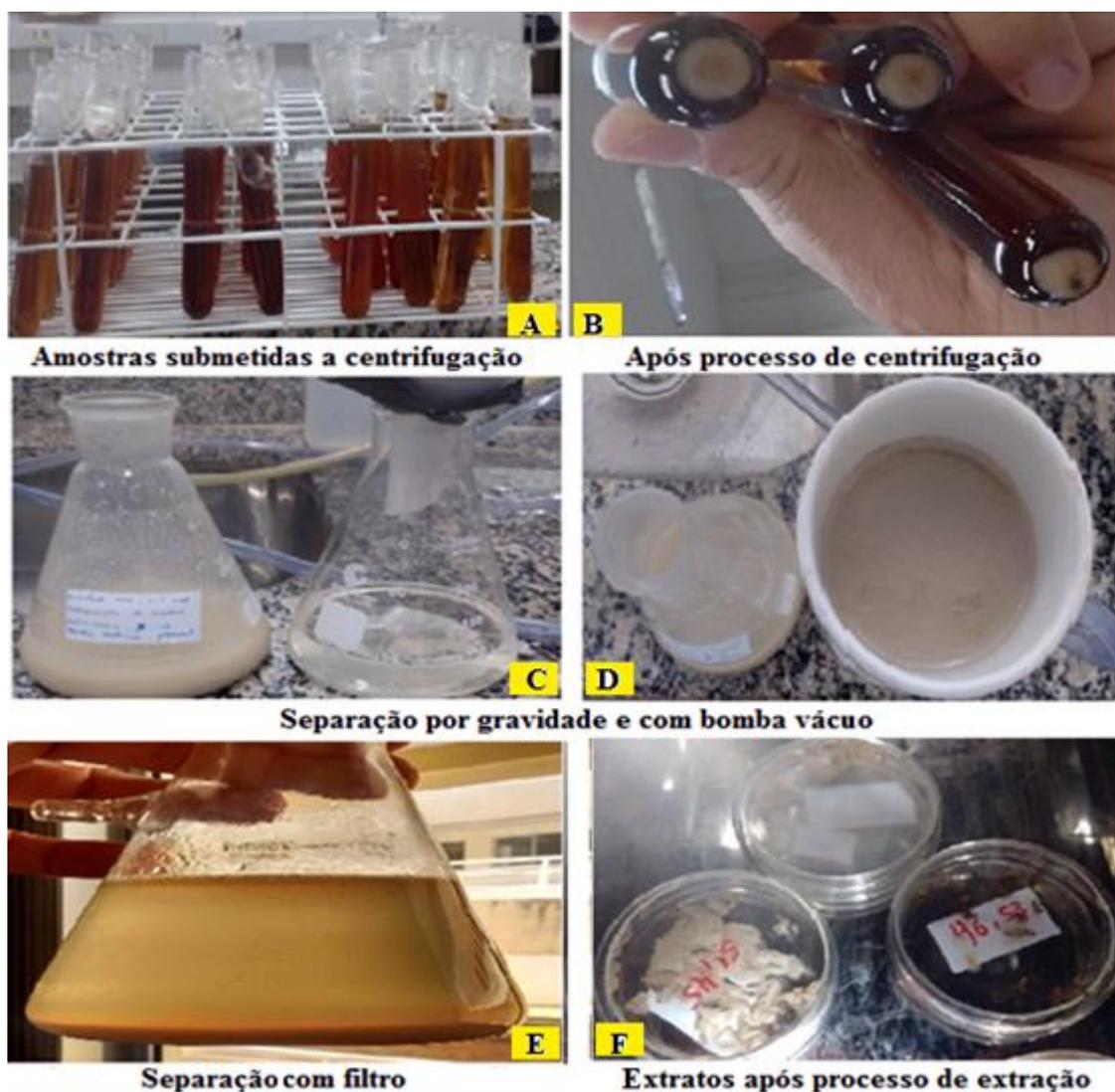
Figura 05 - Etapa inicial do processo de extração por meio do método de Liu (2010).



Fonte: Elaboradas pelo autor da pesquisa no laboratório química orgânica-UNILAB.

Após às 72 horas no agitador orbital ocorreu a separação do meio líquido dos constituintes sólidos, onde a parte líquida foi colocada em tubos de ensaio e centrifugados á (2.500 rpm, 30 min), conforme visto na **figura 06** (A e B). Em seguida ao processo de centrifugação, o material foi lavado com água destilada até atingir o pH 7 e posteriormente imersos uma solução de ácido acético 0,5 Mol com oito gotas de ácido glacial PA, sendo encaminhado as amostras novamente ao agitador orbital nos mesmos padrões acima, permanecendo por 48 horas. Sendo em seguida realizado a separação do extrato bruto “colágeno” mediante o processo de filtração por declividade e bomba de vácuo, imagens (B e C), em seguida armazenado em câmeras resfriadas com temperatura de 15 a 20 °C até as análises e utilização posterior (F).

Figura 06 - Etapa final do processo de extração por meio do método de Liu (2010).



Fonte: Elaboradas pelo autor da pesquisa no laboratório química orgânica-UNILAB.

O segundo método utilizado para extração de material colagenoso, foi desenvolvido com o preparo de diferentes soluções de meio ácidos e básicos sendo estas: Ácido Acético ($\text{CH}_3\text{-COOH}$), Ácido Nítrico (HNO_3), Hidróxido de Sódio (NaOH) e Hidróxido de Amônio ($\text{-NH}_4\text{OH}$) nas seguintes concentrações: vidro I: 0,1 mol; vidro II: 0,5 mol; e vidro III: 1 mol, tendo como base o método de Liu (2010) descrito anteriormente, com intuito de comparar e analisar a influência de tais reagentes e suas concentrações no processo de extração.

Preparo do material/soluções

As amostras e soluções, após pesadas e identificadas, foram submetidas ao agitador orbital, tendo o cuidado de registrar o seu peso diário em tabela e calcular sua média, bem como foram observadas possíveis alterações que viessem a ser apresentadas durante todo o processo de extração.

Após 72 horas de agitação das soluções acima tendo como base o método de Liu (2010), foi realizada a separação dos líquidos dos compostos sólidos, e, em seguida, verificamos o valor do pH destas amostras aquosas com objetivo de deixá-las neutras. Esse processo de neutralização fez-se necessário a utilização de um pHmetro acoplado a um termômetro sendo estas etapas descritas, registradas e observada na figura 07. As soluções utilizadas para neutralizar as amostras aquosas foram hidróxido de sódio e ácido acético PA. Abaixo segue ilustração.

Figura 07 - Processo de neutralização e verificação do pH das amostras de meio líquido providas dos pés de *Gallus gallus domesticus*.



Separação parte sólida/meio aquoso



Verificação e neutralização do Ph

Fonte: Elaboradas pelo autor da pesquisa no laboratório química orgânica-UNILAB.

Vale salientar que o intuito de neutralizar o pH das soluções aquosas foi para submeter os extratos líquidos ao processo de liofilização, tentando evitar possíveis problemas ou danos no equipamento mediante contato com tais compostos químicos ácidos e bases no equipamento. Porém, as amostras, depois de submetidas novamente ao agitador orbital durante 48 horas, foram colocadas no ultrafreezer vertical permanecendo durante 72 horas à - 70 °C graus negativos e após certo período, foram submetidas à etapa de liofilização.

Figura 8 – Amostras submetidas ao processo de liofilização



Fonte: Elaboradas pelo autor da pesquisa no laboratório química orgânica-UNILAB.

Logo após a retirada das amostras do ultrafreezer vertical estando congeladas a menos -70 °C, foram conduzidas em caixa térmica até o Liofilizador Alpha 1-2 LDplus previamente ligado, para dar início ao processo de secagem das amostras por meio do fenômeno de sublimação, ou seja, tendo a mudança do estado sólido para o estado gasoso, sem passar pelo estado líquido, em que o conteúdo de água que encontrasse na forma de gelo foi submetido a um processo de pressão muito baixa e o ar contido nestas amostras seja removido por uma bomba de alto vácuo criando assim a condição de sublimação.

Para o desenvolvimento dos parâmetros de liofilização das soluções aquosas utilizou-se alguns estudos como referência: Offedu et al. (2016), Varley et al. (2016) e Galia et al. (2011). A câmara de resfriamento no interior do equipamento trabalhou com temperatura de -55 °C, com sua taxa de temperatura e pressão parcial do vapor de água inferior (-0,9° C-1) formando uma pressão negativa, permanecendo no equipamento por um período de 48 a 72 horas.

Optamos por tal método com intuito de manter a estrutura do material ‘colagenoso’ mediante a remoção da umidade em baixa temperatura, uma vez que, quando o colágeno é submetido a altas temperaturas, ocorre quebra de sua tripla hélice.

Então, quando liofilizado, pode ocasionar o aumento da sua estabilidade durante período de estocagem e análise, conservando suas unidades proteicas e nutritivas e minimizando possíveis proliferações de microorganismo. Porém, ao fim deste processo, as amostras foram armazenadas e submetidas a realização dos testes.

O terceiro método de extração do material colágeno se fez por meio da utilização de parâmetros físicos, de aquecimento e pressão, onde pesou-se cerca de um quilograma (1 kg) de amostras de pés gallus gallus domesticus, subseguindo a retirando das unhas e lavagem dos mesmos em água corrente para realizar uma limpeza prévia. Em seguida, dividimos tal matéria-prima em duas partes. A primeira contendo peso de quinhentos e dez gramas (510g) e a segunda com (530g).

A primeira parte da amostra foi colocada em uma panela de pressão com aproximadamente trezentos mililitros (300 ml) de água, deu-se início ao processo de cozinhamento sobre pressão por um período de uma hora e dez minutos. Identificando que a matéria-prima encontrava-se amolecida, optamos em triturar todo o material em um triturador com lâminas até apresentar aspecto líquido-pastoso.

Em seguida, ocorreu a filtração deste material para retirada dos componentes mais sólidos, subsequentemente, colocado em um recipiente e encaminhado para congelado, para utilização posterior e testes.

A segunda parte das amostras foi submetida ao **terceiro método de extração**, apresentou peso de quinhentos e trinta gramas (530g), sendo realizado o mesmo processo acima descrito, contudo, a amostragem não foi triturada. Ocorreu, aí, a separação do líquido dos componentes sólidos restantes do processo de cozinhamento com auxílio de uma peneira metálica. Após separação, a parte líquida foi depositada em recipiente apropriado e encaminhada ao processo de resfriamento para possível utilização em testes.

Subsequentemente, estas amostras de extração foram submetidas uma parte ao processo de liofilização, e outra parte encaminhada à estufa com temperatura

contínua controlada de trinta e sete graus Celsius (37 °C) para verificar os aspectos de alteração apresentados pelas mesmas.

5.2. Testes bacteriológicos

O teste bacteriológico permite analisar se determinado extrato ou amostra dispõe ação inibitória no crescimento de microorganismos, desde que estes microorganismo contenham um registro que denominamos de cepas ou estirpe, garantindo o conhecimento da sua linhagem.

Ou seja, é um grupo comum de ancestrais com boa semelhança morfológica e fisiológica, contendo um número de registro ATCC, - American Type Culture Collection (ATCC) é a Autoridade Depositária Internacional que representa a coleção de microorganismos Norte Americana, garantindo assim o conhecimento da sua origem sendo oriundo de certos grupos de cultura mundialmente distinto e conhecido.

As amostras obtidas do processo de extração foram testadas contra microorganismos (bactérias e fungos) por meio do método de difusão em disco, ágar e poço, tendo o intuito de tentar evidenciar se existia ação antibactericida e fungicida. Onde em determinados casos, que se se obtivesse ação previamente detectada de atividade antimicrobiana, determinaríamos à ação inibitória mínima (CIM).

Todo o método de realização deste teste foi regido pelo protocolo das Normas de Desempenho para Testes de Sensibilidade Antimicrobiana, regidos pela Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) e a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA).

5.2 Microrganismos Utilizados

Tabela 2 – Relação dos Microrganismos Utilizados em teste bacteriológico com registro de ATCC e Perfil de Controle utilizado.

MICROORGANISMOS	TIPO	REGISTRO DE ATCC	PERFIL DE CONTROLE
Staphylococcus aureus	Bactéria	6538	ciprofloxacina 500mg
Escherichia coli	Bactéria	8739	ciprofloxacina 500mg
Klebsiella pneumoniae	Bactéria	13883	ciprofloxacina 500mg
Salmonella	Bactéria	10708	ciprofloxacina 500mg
Pseudomonas aeruginosa	Bactéria	9027	ciprofloxacina 500mg
Candida albicans	Fungi	10231	Fluconazol 150mg

Fonte: Elaboradas pelo autor da pesquisa no laboratório química orgânica-UNILAB.

5.2.1 Preparo das placas com microorganismos para teste

Inicialmente, reuniu-se todo o material: placas petris esterilizadas, alças microbiológicas, lamparina de álcool em vidro, microorganismos e meio de cultura Agar mueller hinton para as bactérias e Agar nutriente para fungo, sendo estes meios diluídos em água destilada no Erlenmeyer de 1000mL, obedecendo as proporção de dissolução para preparo do meio, conforme indicado pelos fabricantes, e submetido a processo de autoclavagem, sendo visualizado meios prontos para uso na Figura 09.

Figura 09 – Meio de culturas e preparação das placas petris para teste bacteriológico.



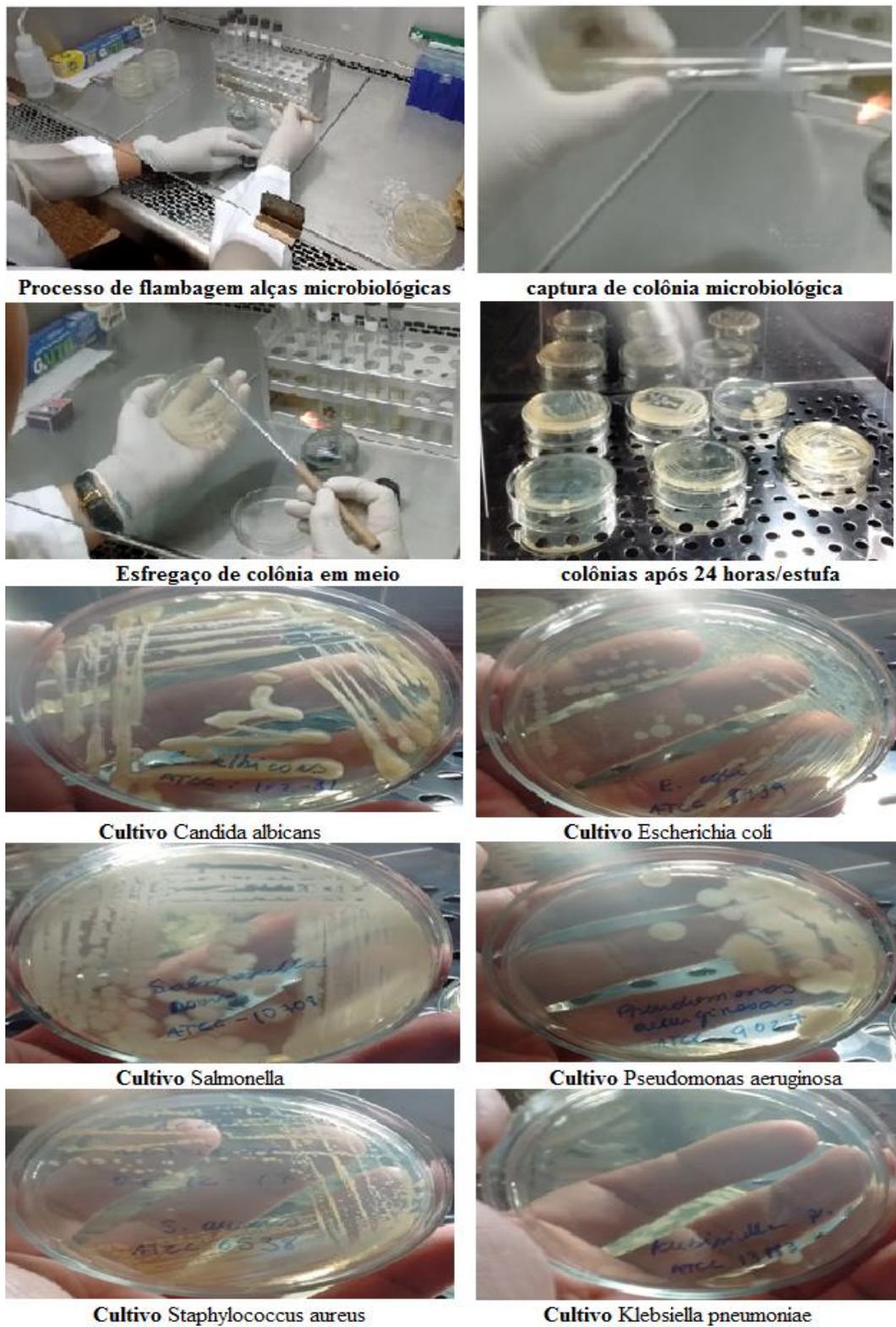
Fonte: Elaboradas pelo autor da pesquisa no laboratório microbiologia-UNILAB.

Subsequente todo o material utilizado foi colocado na capela de fluxo laminar em contato com ultravioleta –UV que encontrava-se previamente ligada por trinta minutos. Os meios de cultura foram espalhados nas pequenas placas petris mantendo um diâmetro de aproximadamente seis milímetros, onde após secagem realizamos a semeadura das bactérias e fungo em tais placas conforme visto na figura 10.

A semeadura dos microorganismos nas placas foi por meio da alça microbiológica podendo ser vista etapa na primeira imagem da figura 11, no qual fez-se a escolha de três colônias, realizado o esfregaço destas, em toda a placa para seu cultivo. Em seguida, transferimos este material para uma estufa de cultura bacteriológica com temperatura controlada de trinta e sete graus (37 °C) por um período de 24 horas onde

obtivemos o crescimento dos microrganismos utilizados nesta pesquisa, podendo ser visto tais etapas descritas acima na figura 10.

Figura 10 – Etapas do processo de semeadura e cultivo de microrganismos



Fonte: Elaboradas pelo autor da pesquisa no laboratório microbiologia-UNILAB.

5.2.2 Preparo da solução e extrato de colágeno para teste bacteriológico

No preparo das soluções colagenosas para o teste bacteriológico, foi utilizado dois extratos provindos do processo de extração que mantinham maior similaridade visual com o colágeno padrão que obtemos da farmácia de manipulação.

Uma porção de quatro miligramas de cada material foi misturado com dois ml de água destilada e levado ao agitador magnético com aquecimento a uma temperatura de trinta e quatro graus Celsius (34°C) contínuo por um período de três horas, e em seguida, conduzimos estes extratos até a capela de fluxo laminar UV para sua utilização.

5.2.3 Preparação de placas e material colagenoso

Após o cultivo dos microorganismos, realizamos a preparação das placas Petri, colocando cerca de quarenta ml dos meios de cultivo, deixando as placas com dimensão de 6 milímetros de diâmetro e retirando as bolhas de ar quando formadas.

Realizamos triplicata para todas as amostras cujo objetivo de manter uma melhor precisão dos resultados obtidos na forma de poço, ágar e disco. Todos os procedimentos foram realizados dentro da capela de fluxo laminar UV onde o pesquisador encontrava-se devidamente amparado com equipamento de proteção individual EPI.

Utilizamos o aparelho de espectrofotometria para verificar a leitura da densidade óptica (DO) das amostras contendo colônia diluída em água destilada, deixando as mesmas para o comprimento de onda aproximado à 500 monômeros, para somente em seguida serem utilizadas nas placas com meio de cultivo. Isso se faz necessário para evitar superpopulação e possível resistência do mesmo ao agente controle, sendo exposto na tabela 3 os valores tabelados dos espectrofotometro das DO das colônias utilizadas para evitar possíveis interferências e resultados falso positivos.

Tabela 3: Valor espectrofotometro das amostras diluídas em água destilada para cultivo.

MICROORGANISMOS	TIPO	REGISTRO DE ATCC	VALOR ESPECTROFOTOMETRO
<i>Staphylococcus aureus</i>	Bactéria	6538	0,473
<i>Escherichia coli</i>	Bactéria	8739	0,483
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Bactéria	13883	0,455
<i>Salmonella</i>	Bactéria	10708	0,459
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Bactéria	9027	0,486
<i>Candida albicans</i>	Fungi	10231	0,452

Fonte: Elaboradas pelo autor da pesquisa no laboratório química orgânica-UNILAB.

O preparo das placas na forma de ágar se diferenciou por ser colocado cerca de vinte mL na placa, e os outros vinte mL foram homogeneizados com os agentes microbiológicos diluído em um mL de água destilada.

Após realizado tal dissolução, juntamos os vinte mL previamente manipulados em contato com os outros 20 mL já presentes na placa, sendo posicionado o disco controle com agente antimicrobiano no centro da placa e ao redor, no qual, aplicamos 10 microlitros- μ L da solução com extratos colagenoso em discos de papel filtro de 6 milímetros- mm de diâmetro, obtendo assim a constrição da placa conforme apresentado na Figura 11.

Figura 11 – Demarcação da implantação dos discos na placa petri com meio de cultura.



Fonte: Elaboradas pelo autor da pesquisa no laboratório microbiologia-UNILAB.

Quanto ao método em disco, foram colocados quarenta mL de ambos os meios de forma uniforme e retirando as bolhas de ar quando formadas, com cuidado para não contaminar o meio de cultura. Depois de enrijecido o meio, pegamos um swab

Figura 13 – confecção dos poços na placa petri com microrganismos semeados.



Fonte: Elaboradas pelo autor da pesquisa no laboratório microbiologia-UNILAB.

Enfatizamos que em todo o processo de pipetagem, foi utilizada uma ponteira esterilizada para cada poço e disco das soluções/extratos, sendo as mesmas descartadas após utilização e em caso das pinças sendo sempre flambadas. Onde a figura 13 representa etapa de pipetagem e colocação dos discos junto ao meio de cultivo.

Figura 14 – Processo de pipetagem de amostras de colágeno e extratos obtidos por meio ácido e básico dos pés de *gallus gallus domesticus* junto a placas de Petri semeadas.



Imagens ilustrativas dos procedimentos realizados conforme descritos acima.

Fonte: Elaboradas pelo autor da pesquisa no laboratório microbiologia-UNILAB.

Posteriormente todas as placas, conforme acima descrito, foram direcionadas para a estufa microbiológica com temperatura controlada de trinta e sete

graus Celsius (37°C) por um período de vinte quatro (24h) e quarenta e oito horas (48h), sendo realizado a observação das mesmas, conforme período de tempo.

6.1 Espectroscopia de Absorção na Região do Infravermelho (FTIR)

Para obter-se os espectros das amostras estudadas, foi realizada uma maceração em um almofariz de ágata e prensadas em uma pastilha de brometo de potássio (KBr) sobre uma pressão de 8t para formar a composição da pastilha. Após realizada a prensagem, os espectros foram registrados no intervalo de comprimento de onda entre 4000 a 400 cm^{-1} . A análise foi realizada em um equipamento Perkin Elmer, modelo 16 PC, no Departamento de Química Orgânica e Inorgânica da UFC.

6.2 Cromatografia de Permeação em Gel

O perfil cromatografia do colágeno foi determinado em um cromatógrafo SHIMADZU LC-10AD com detector de índice de refração RID-10^a a 40 °C. sendo utilizando uma coluna SB806M HQ (shodex), fase móvel composta por solução tampão de CH_3COOH 0,33M / NaOH 0,1 M com fluxo de 1 ML /min. As amostras foram dissolvidas na solução tampão supracitada na concentração de 1mg/ml (0,1% m/v). Para a obtenção da curva de calibração, sendo utilizados os padrões de polietilenoglicol (PEG) da malvern com os seguintes pesos moleculares: 498000, 258000, 170200, 65000, 10250, 3450 e 1050 g/mol.

6.3 Métodos de Quantificação de Proteínas.

Para a realização da quantificação de proteína, utilizamos como protocolo o Manual da BIO RAD DC Protein Assay Instruction com auxílio do espectrofotômetro. Haja visto que há um padrão universal reconhecido para quantificação proteica.

Inicialmente realizamos esse teste com sete amostras, sendo estas: amostra A1 extrato com osso liofilizado, A2 extrato com osso submetido a estufa, A3 extrato de ácido acético liofilizado, A4 extrato ácido nítrico liofilizado, A5 extrato da raspa do hidróxido de sódio a 1mol, A6 extrato de hidróxido de sódio, e A7 colágeno padrão.

A seguir pesou 1mg de cada amostra/extratos em eppendorf e realizamos a diluição destas em solução padrão tampão de ácido acético e acetato de sódio para um

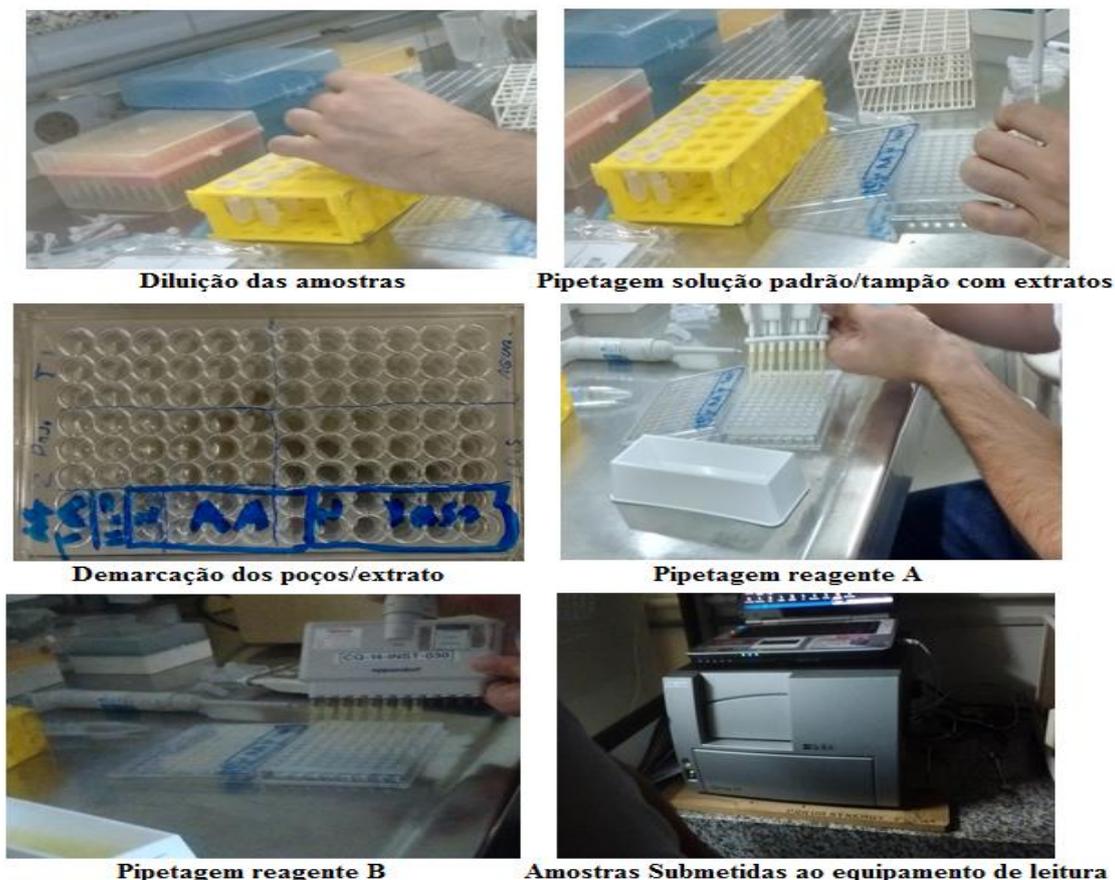
Ph 4, ácido acético a 0,5 mol, Dimetilsulfóxido – DMSO e solução tampão, Água Milli-Q. sendo realizado teste em triplicata.

A curva padrão foi realizada com amostra do extrato A7 de colágeno padrão, onde pipetamos 5 µl de solução padrões/tampão com as outras amostras diluídas e colocadas em uma placa de cultura celular em poço, limpa e seca. Incorporando 25 µl do reagente A da BIO-RAD em cada poço, após 200 µl de reagente B da BIO-RAD em ambos os poços com ausência de luz, em seguida realizado a mistura das soluções nos poços com cuidado para não formar bolhas e contaminar as soluções. Sendo tais etapas registradas conforme demonstrado em figura 14, as respectivas etapas que envolvem o processo de quantificação e proteína e espectro uv de proteína.

Após quinze minutos da preparação das soluções nos poços, foi realizada a quantificação de proteína de ambas as amostras pipetadas, e desenvolvidos os espectros de proteínas das mesmas, partindo das absorvâncias de 0 a 800 nm no aparelho biotek synergy ht com software próprio do equipamento no laboratório da Farmacognosia da UFC.

Tendo a identificação dos valores de referência do colágeno padrão e valores obtidos das amostras/extratos, foram registamos em planilha do Excel para posterior apreciação. Abaixo segue imagens das etapas realizadas.

Figura 15 - Etapa do processo de quantificação de proteína.



Fonte: Elaboradas pelo autor da pesquisa no laboratório farmacognosia da UFC.

6.4 Espectroscopia UV-visível de colágeno

O teste de espectroscopia UV foi realizado conforme protocolo estabelecido em estudo por Duan et al. (2009) e Li et al. (2004). Com aparelho biotek synergy ht com software próprio do equipamento no laboratório da Farmacognosia da UFC onde realizamos a determinação da absorvância nos comprimentos de onda de 200 nm a 800 nm, do espectros UV-Vis para cada amostra. A preparação das amostras obedeceu ao mesmo método de quantificação de proteínas acima descritos.

6.5 Eletroforese

Utilizamos como protocolo para este teste o manual de métodos de análise em laboratório de biotecnologia agroalimentar e de saúde humana da editora univates, 2014. Tal técnica se baseia na separação de fragmentos de espécies eletricamente carregadas, quando expostas a uma corrente elétrica.

Foram desenvolvidos dois géis de corrida para a eletroforese, sendo o primeiro na concentração de 4% (quatro por cento) e segundo 7,5% (sete e meio por cento) fazendo com que o primeiro gel a 4 % fique sobreposto ao segundo gel de 7,5 %.

Para garantir uma boa corrente de corrida elétrica nos géis, elaboramos uma solução tampão com Tris-acetate e ácido clorídrico – HCL a 0,5 mol com o Ph de 6,8 e 8,8.

6.5.1 Preparo do gel.

Inicialmente realizamos a separação dos elementos essenciais para a preparação dos géis de eletroforese, sendo estes listados abaixo juntamente com seus valores de referência utilizados.

Gel a de 7,5 % (sete e meio por cento)

- Água ultrapura Milli 4,85 ml (quatro vírgula oitenta cinco).
- Tris-acetate a 1, mol com seu Ph de 8,8 2,5 ml (dois vírgula cinco).
- Acrilamida 30,08 % 2,5 ml (dois vírgula cinco).
- Dodecil-sulfato de sódio (SDS) a 10 % 100 µl (cem microlitros).
- Persulfato de amônio (APS) 85 µl (oitenta e cinco microlitros).
- Tetrametiletenodiamina (TEMED) 8,5 µl (oito vírgula cinco microlitros).

Gel a de 4 % (quatro por cento)

- Água ultrapura Milli 3,68 ml (três vírgula sessenta oitenta).
- Tris-acetate a 0,5 mol com seu Ph de 6,8 630 µl (seiscentos e trinta microlitros).
- Acrilamida 30,08 % 675 µl (seiscentos setenta e cinco microlitros).
- Dodecil-sulfato de sódio (SDS) a 10 % 50 µl (cinquenta microlitros).
- Persulfato de amônio (APS) 25 µl (vinte e cinco microlitros).
- Tetrametiletenodiamina (TEMED) 5,5 µl (cinco vírgula cinco microlitros).

A pipetagem das soluções acima foi realizada conforme a sequência da lista, porém, quando realizado a pipetagem da Acrilamida, manteve-se cuidado devido o nível de toxicidade e a natureza acumulativa que a mesma ocasiona ao organismo.

Após junção de todos os elementos listados, realizamos a homogeneização e a pipetagem da solução final preparada nas placas de vidro de corrida, onde adicionamos no final cerca 1,5 ml (um mililitro e meio) isopropanol junto a placa de vidro para retirar bolhas de ar, e tornar a superfície do gel lisa, auxiliando na corrida da eletroforese.

Ressaltamos que inicialmente foi realizado a pipetagem das soluções que continha o gel de 7,5 % (sete e meio por cento) até próximo a superfície da placa de vidro, sendo pipetado por ultimo o gel a de 4 % (quatro por cento) e sucedendo a colocação das placas para formação dos poços de corrida onde foi adicionado as amostras para verificar seu peso de corrida após a polimerização do gel, no qual a figura 16 representa determinado procedimento.

6.5.2 Preparação da solução de corrida

A solução de corrida que fica envolta da placa de vidro com o gel polimerizado foi preparada com Tris-glicina a 10 % (dez por cento), sendo esta uma solução tampão, mais 900 ml (novecentos ml) de Água ultrapura Milli e Dodecil-sulfato de sódio (SDS) 10 ml (dez mililitros).

6.5.3 Preparo das amostras para eletroforese

As amostras submetidas a este teste foram a amostra A1 extrato com osso liofilizado, A2 extrato com osso submetido à estufa, A3 extrato de ácido acético liofilizado, A4 extrato ácido nítrico liofilizado, A5 extrato da raspa do hidróxido de sódio a 1mol, A6 extrato de hidróxido de sódio, e A7 colágeno padrão. Foi pesado e diluído 1 mg (um miligrama) para 1 ml (um) em água ultrapura Milli.

Após homogeneização das amostras acima pegamos 35 µl (trinta e cinco), mais 11,7 µl (onze vírgula sete) tampão da amostra que encontrava-se seis vezes diluída, sendo este uma mistura de glicerol, azul de bromofenol.

Em seguida, cerca de 30 μ l foram pipetados nos poços produzidos no gel de acrilamida na estrutura da eletroforese montada que encontrava-se envolvida pela solução de corrida. Cada poço representa um tipo de amostra. Feita tal etapa, ligamos os eletrodos em seus respectivos polos, mantendo uma voltagem de 50 (cinquenta) volts durante 22 minutos (vinte e dois) e posteriormente aumentando a corrente para 150 (cento e cinquenta) volts até observar a corrida da voltagem em toda estrutura do gel. Podendo ser vista certa etapa que constitui o processo de eletroforese na figura 16.

6.5.4 Lavagem do gel de corrida/eletroforese

Com o termino da corrida elétrica na placa de eletroforese, retiramos o gel com cuidado para não danificar sua estrutura, em seguida, tal gel foi colocado em contato com azul de bromofenol puro durante 35 (trinta e cinco) minutos para corar e identificar as bandas registradas no processo de eletroforese.

A soluções preparadas para o processo de lavagem foram compostas por 25 ml (vinte e cinco) de etanol, 7,5 ml (sete e meio mililitros) de ácido acético PA e 67,5 ml (sessenta e sete e meio mililitros) água ultrapura Milli, objetivando a retirada do excesso do corante e deixando as bandas visíveis para realizar análise dos resultado obtidos deste teste.

Figura 16 – Representação de algumas etapas do processo de eletroforese desta pesquisa.



Preparação das amostras



Preparação das placas de vidro/gel



Solução tampão de corrida



Cuba de eletroforese com solução de corrida



Retirada da demarcação dos poços



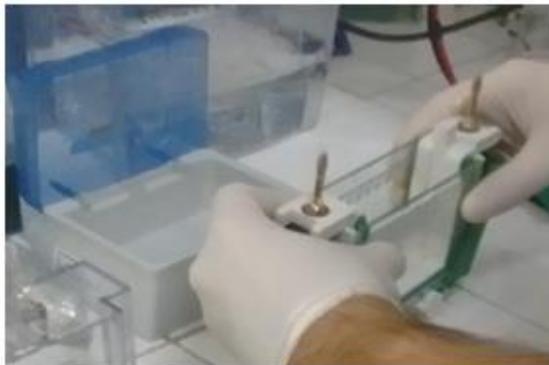
Pipetagem das amostras nos



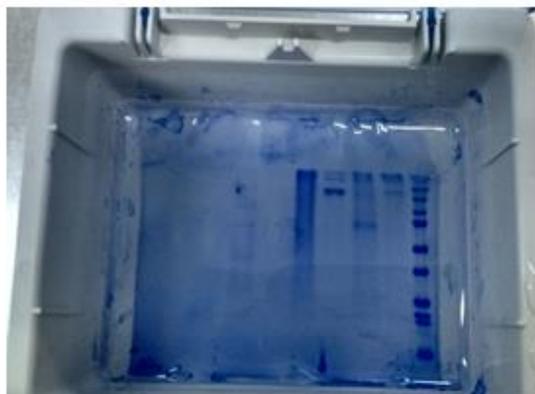
Início de corrida eletroforese



Fonte da eletroforese



Retirada do gel de eletroforese das placas de vidro após corrida



Processo de lavagem da solução azul de bromofenol para identificação de bandas

Fonte: Elaboradas pelo autor da pesquisa no laboratório farmacognosia da UFC.

6.6 Ensaio de toxicidade do extrato com a *Artemia salina*.

A presença de componentes tóxicos em compostos animais e vegetais é bastante comum, podendo corroborar efeitos graves no organismo humano quando em contato em médio e longo prazo, o que faz necessária a realização desse teste, que visa identificar o nível de toxicidade, para garantir a qualidade do extrato e produtos sem expor risco ao homem quando em contato com o mesmo.

O teste de toxidade realizado com *Artemia salina* é um ensaio biológico que utiliza um organismo alvo para avaliar a existência de ação dos compostos bioativos dos extratos e presença de toxicidade aguda do meio testado (LUNA et al., 2005).

Utilizamos como protocolo para a realização deste teste os estudos dos Meyer et al. (1982) e Nascimento et al. (1999) como algumas alterações, contudo, tal técnica apresentada pelos mesmos são aplicadas e trabalhadas em estudos recentes por pesquisadores de diferentes instituições.

Para a realização deste experimento fez necessário o preparo de uma solução com água e cloreto de sódio, na proporção 30g L⁻¹, deixando o seu Ph em 8. Após o preparo da solução, pegamos um recipiente de vidro “béquer” de 1750 ml, sendo inserida em seu interior na parte central, uma tela com diâmetro de 0,02 cm de espessura espaçada 0,21mm, gerando uma divisão e formando dois espaços como está apresentado na Figura 17.

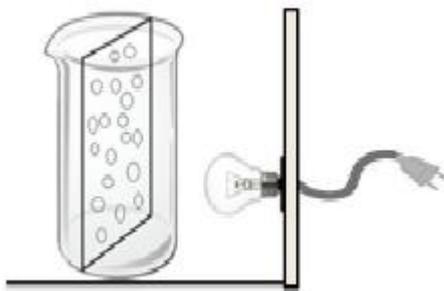
Em seguida, foi colocada a solução salina preparada cerca de 1500 ml no béquer. Após isso, adicionamos em um dos lados cerca de 50 mg de cistos de *Artemia salina* com cuidado para que os mesmos não se direcionassem para o outro lado do recipiente, que continha apenas solução salina. Sendo iluminado por uma lâmpada de led 10w que encontrava-se posicionada do outro lado com objetivo de atrair os organismos da *Artemia salina* para o outro lado do sistema proporcionando assim uma uniformidade da população utilizada.

Ressaltamos que a temperatura manteve-se controlada em torno dos 28 a 30 °C por meio de um termômetro digital. Todo recipiente envolvido com papel alumínio para auxiliar na eclosão dos cistos, sendo escolhidos e utilizados para o estudo aqueles que demonstraram maior resistência e uniformidade quanto ao tamanho, conforme

separação por tela no interior do recipiente, e que foram atraídos para o outro lado da tela pela luz.

Tal escolha visa certa homogeneização das condições físicas dos organismos-testes. No que se trata ao período de incubação, foi em torno de 48 horas, porém evidenciamos a presença dos cistos já nas primeiras 24 horas.

Figura 17- Esquema ilustrativo do sistema desenvolvido para eclosão dos cistos da *Artemia salina*.



Fonte: (SOUZA, 2011).

6.6.2 Preparação das amostras com *Artemia salina*

Após a eclosão dos nauplios eclodidos que conseguiram ultrapassar a tela divisória que se encontrava no centro do béquer no lado apostado que foi cultivado, foram capturados com uma pipeta de Pasteur e transferidos 10 *Artemia salina* para tubos de ensaio que continha em seu interior 4 ml da mesma solução salina preparada para sua eclosão no início.

Os testes foram realizados em triplicata para cada concentração de extrato/composto desta análise, bem como o desenvolvimento de vários ensaios com intuito de comprovar tal resultado e adaptações realizadas no mesmo no que trata o teste de toxicidade. Teve-se a preocupação para que os produtos diluentes do extrato bem como preparação da solução de cultivo e manutenção das lavas não influenciassem no resultado falso positivo ou negativo deste teste.

As concentrações utilizadas para este teste foram 1; 500; 250; 125; 062; 0,31 mg- mL⁻¹ para cada amostra, sendo todas amostras dissolvidas na mesma solução

salina de cultivo em concentração decrescente, onde tais valores utilizados foram referenciados por outros estudos desenvolvidos com esta metodologia.

Utilizando o método para calcular a dose letal – DL , remetendo o extrato ou composto de baixa toxicidade quando a dose letal for inferior a 50 % (DL50) superior a 500 mg - mL⁻¹, moderada toxicidade para DL50 entre 100 a 500 µg mL⁻¹ e bastante toxica quando este valor da DL50 vier a ser inferior á 100 µg mL⁻¹ conforme estudo de Amarante et al. (2011).

6.6.3 Contagem das *Artemia salina*

A contagem deste ensaio biológico fez mediante as primeiras 24 e 48 horas após pipetagem das larvas nos tubos de ensaio com soluções/extrato nas respectivas concentrações, levando em conta os náuplios vivos todos aqueles que apresentavam movimentos no interior do tubo mediante atração pela luz, e mortas aquelas que encontrava-se no fundo dos tubos sem qualquer movimento. Utilizamos uma lupa de aumento para melhor visualização e contagem. Sendo registrado tais valores em planilha do Microsoft Office Excel e trabalhado seus resultados estatísticos mediante média conforme registros dos dados nas 24 - 48 horas.

7. RESULTADOS E DISCUSSÃO

7.1 Método de Extração

Quanto ao primeiro processo de extração com base no método de Liu (2010), se fez algumas adaptações. Em virtude de não encontramos um método específico para extração de colágeno provindo de *gallus gallus*, evidenciou-se que por este método, com o passar dos dias, os extratos obtidos por meio de hidróxido de sódio em contato com a matéria-prima teve uma diferenciação de sua cor, como pode ser visto na Figura 18 que remete tal etapa. No qual, no primeiro dia, encontrava-se com realce claro evoluindo para uma pigmentação meio escurecida, conforme registros abaixo.

Figura 18 – Amostras em contato com a solução utilizada e seu registro no decorrer do processo de extração método de Liu (2010).



Amostra nas primeira 24 horas



Amostra em 48 horas



Amostra após 72 horas



Amostras centrifugadas após 72 horas

Fonte: Elaborada pelo autor da pesquisa no laboratório de química organica -UNILAB

Assim como todas as amostras, quando em contato com a soluções, não obtiveram ganho e perda de peso significativo em todo o processo de extração, em que foi realizado o cálculo da média de seu peso, sendo encontrado uma certa aproximação da média final dos valores de cada amostra em ambos os dias de pesagem. Certa

variação dos valores de pesagem podem estar atribuídos ao manuseio das amostras ou variações/interferência do meio físico, como a balança. Onde os registros dos valores obtidos destas amostras/metodo são expostos na Tabela 4.

Tabela 4- Registro de peso das amostras durante processo de extração.

SOLUÇÃO DE NAOH 0,1 MOL E CH ₃ CO ₂ H 0,5 MOL							
PESO TOTAL DIA							
PESO	VIDRO	AMOSTRA	SOLUÇÃO	PESO I DIA	PESO II DIA (g)	PESO III DIA (g)	MÈDIA Em (g)
	(g)	(g)	(g)	(g)			
VIDRO I	177,75	120,1	165,49	463,34	463,19	462,95	463,16
VIDRO II	112,58	120,13	175,57	408,28	407,26	407,04	407,527
VIDRO III	125,62	120,61	181,74	427,97	429,01	428,84	428,607

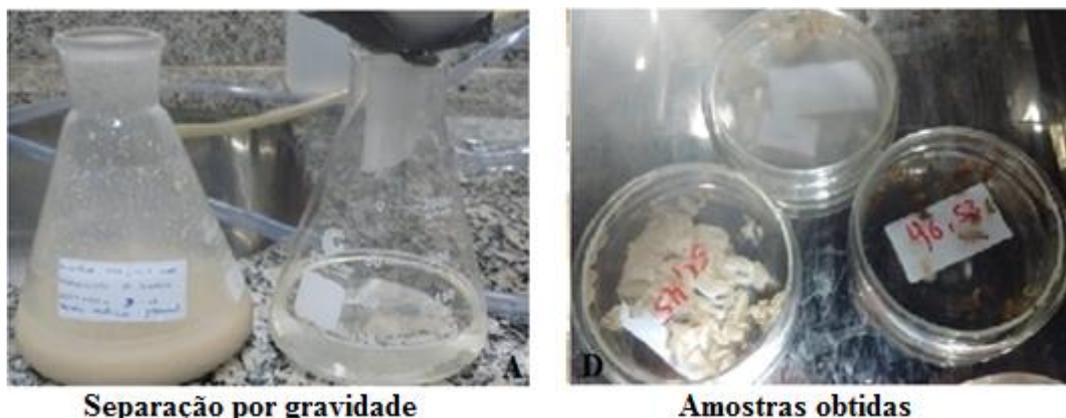
Fonte: Elaborada pelo autor da pesquisa no laboratório de química organica -UNILAB

Durante a realização do processo acima, notamos a presença de odor forte, com característica de cheiro fétido, porém, após o processo de centrifugação e retorno ao processo de agitação com solução de ácido acético a 0,5 mol, tais aspectos acima citados tonou-se minimizado.

Com o término da primeira fase de agitação, foram adicionadas gotas da solução de ácido acético glacial PA nas soluções aquosas acima. Constatamos a formação de uma massa no meio líquido, e mudança da tonalidade das substâncias, que encontravam-se escurecidas para um meio acinzentado conforme visualizado na Figura 19, em espaço de tempo de 48 horas após contato com ácido glacial PA.

Portanto, essa massa formada não apresentava as características anteriores como mal odor “fétido”, sendo ela aparentemente maleável e consistente. Porém, quando colocada ao meio ambiente, e sobre estufa a 37°C, a mesma se tornou bastante rígida, forte, firme e maciça, com cor escurecida sendo visualizado certa amostras na figura 19.

Figura 19 – Processo de separação de substancias/filtração.



Fonte: Elaborada pelo autor da pesquisa no laboratório de química organica -UNILAB

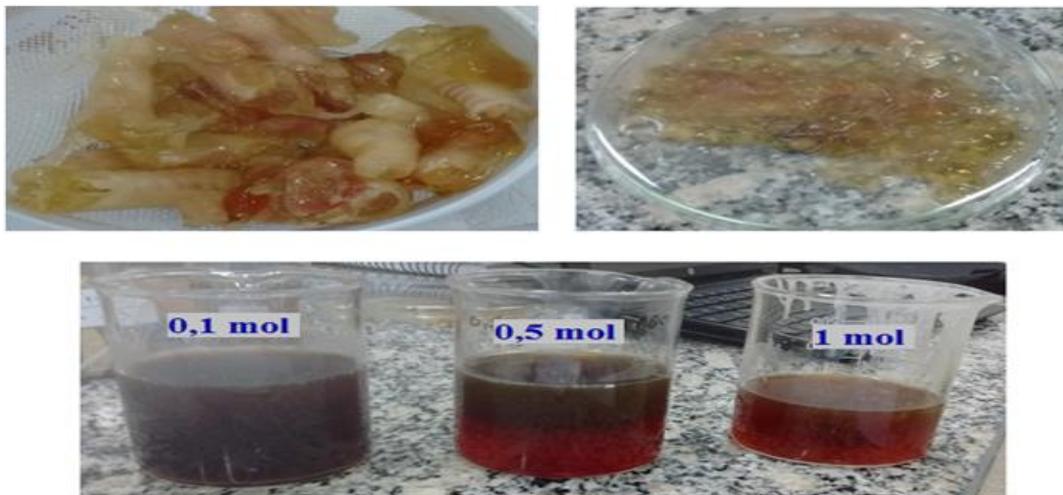
Mediante este processo de extração, reconhecemos que o extrato obtido apresentou uma variação em seu peso, podendo estar relacionada à matéria-prima utilizada e método aplicado, assim como a necessidade ter equipamentos específicos, uso de reagentes químicos e demanda de tempo em média de 120 horas para concluir todo o processo de extração. Sendo que quando não observado o protocolo de extração poderá influenciar o valor total obtido do extrato bruto e não obtenção do mesmo.

Os rendimentos das amostras foram os seguintes: amostra I 51,45 mg; amostra II, 46,53mg; e amostra III 23,51 mg, totalizando um valor de extrato, quando somado todas as amostras de 121,49 mg. Calculamos o rendimento da mesma em porcentagem, onde constatamos seu rendimento em porcentagem mediante cálculo 29,63% de produto extraído quando observado o valor total da matéria-prima utilizada e submetida a esse método de extração.

No segundo processo de extração, utilizamos as soluções em meio ácido e meio básico sendo: Ácido Acético $\text{CH}_3\text{-COOH}$, Ácido Nítrico HNO_3 , Hidróxido de Amônio $\text{-NH}_4\text{OH}$ e Hidróxido de Sódio NaOH , nas concentrações de 0,1 mol, 0,5 mol e 1 mol, sendo irmerso nas amostras nessas concentrações.

As amostras, quando em contato com a solução de hidróxido de sódio nas concentrações já citadas, em suas primeiras horas denotaram um aspecto turvo, progredindo para uma tonalidade escurecida e meio avermelhada. No entanto, notamos que quanto maior a concentração usada, maior denotação das amostras com aparência gelatinosa, brilhante e amarelada sobre a matéria prima utilizada, podendo ser visto tal fato na Figura 20 e cor das soluções nas suas respectivas concentrações testadas.

Figura 20 – Extratos e resítuos obtidos mediante solução de Hidróxido de sódia em diferentes concentrações.



Fonte: Elaborada pelo autor da pesquisa no laboratório de química orgânica -UNILAB

Após às 72 horas em contato com a substância de hidróxido de sódio foi realizada a retirada desse resíduo gelatinoso com auxílio de espátulas, sendo colocada em uma placa de Petri para análise posterior. A parte líquida foi separada da sólida, sendo submetida a processo de liofilização após neutralização do pH. Segue abaixo Tabela 5 com os registros dos pesos obtidos nas primeiras 72 horas das amostras de hidróxido de sódio nos diferentes tipos de concentrações.

Tabela 5: Registro de peso da amostra submetida em solução de hidróxido de sódio nas concentrações de 0,1 vidro I, 0,5 vidro II e 1 mol vidro III.

SOLUÇÃO DE HIDRÓXIDO DE SÓDIO À 0,1, 0,5 E 1 MOL							
PESO TOTAL DIA							
PESO	VIDRO	AMOSTRA	SOLUÇÃO	PESO I	PESO II	PESO III	MEDIA
	(g)	(g)	(g)	DIA (g)	DIA (g)	DIA (g)	(g)
VIDRO I	180,75	120,2	177,81	478,76	478,33	478,21	478,433
VIDRO II	133,78	120,51	183,17	437,46	437,26	437,27	437,33
VIDRO III	145,12	120,14	169,29	434,55	434,2	434,31	434,375

Fonte: Elaborada pelo autor da pesquisa no laboratório de química orgânica -UNILAB

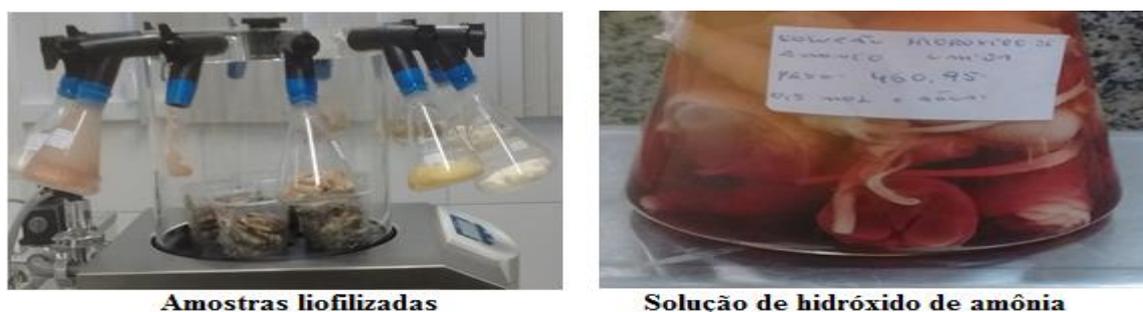
No entanto, à parte líquida que foi obtida pelo processo de separação, quando submetidos ao processo de liofilização, não registamos nenhum um problema durante esta etapa. Com a utilização desta solução foi possível obter extrato de ambas as amostras antes do processo de liofilização e após tal processo.

Porém mesmo obtendo dois extratos mediante utilização de tal solução, notamos a presença de cheiro forte, risco de contaminação e irritação de mucosa no processo de manipulação da solução, necessidade de equipamentos específicos e tempo para realizar o processo de extração.

Já quando utilizamos o **hidróxido de amônia**, observamos nas primeiras horas aspecto turvo, evoluindo para uma cor escurecida e avermelhada, em todas as concentrações testadas. Assim como também não notamos a presença do odor fétido que foi apresentando nas amostras de hidróxido de sódio, bem como a formação de um porte gelatinoso, claro e brilhoso.

Porém, quando a parte líquida das amostras de **hidróxido de amônia** foram submetidas ao processo de liofilização, tiveram que ser retiradas do equipamento por formar uma espuma no interior do Erlenmeyer que evoluiu para câmara de resfriamento do liofilizador, podendo esta contaminar ou interferir nas outras amostras. Portanto, tal solução para o processo de extração de possível material colágeno a base de pé do gallus gallus domesticus não apresentou um resultado tão positivo conforme método utilizado, podendo ser visualizado tal fato em Figura 21 que representa o extrato passando do Erlenmeyer para câmara de resfriamento do liofilizado, bem como, amostras em contato com solução.

Figura 21 – Extrato líquido obtido por hidróxido de amônia, e submetido a processo de liofilização.



Fonte: Elaborada pelo autor da pesquisa no laboratório de química orgânica-UNILAB

No que trata sobre o peso das amostras, todas estas apresentaram certa variação dos valores de pesagem. Porém, quando calculado a média de seu peso, constatamos que a média encontra-se compatível aos valores de referência de pesagens e registros das amostras registradas diariamente, sendo tais valores impressos na Tabela 6 abaixo.

Tabela 6 - Registro de peso da amostra submetida em solução de hidróxido de amônia nas concentrações de 0,1 vidro I, 0,5 vidro II e 1 mol vidro III.

HIDRÓXIDO DE AMÔNIO NH₄OH 0,1, 0,5 E 1 MOL							
PESO	VIDRO	AMOSTRA	SOLUÇÃO	PESO TOTAL DIARIO			MÉDIA
				PESO I	PESO II	PESO III	
	(g)	(g)	(g)	DIA (g)	DIA (g)	DIA (g)	(g)
VIDRO I	126,81	100,83	259,01	359,84	359,71	359,42	359,65
VIDRO II	144,75	120,62	315,7	436,32	436,11	436,25	436,22
VIDRO III	111,18	119,78	284,85	404,63	404,43	404,34	404,46

Fonte: Elaborada pelo autor da pesquisa no laboratório de química orgânica-UNILAB

As amostras, quando em contato com a solução de ácido nítrico nas concentrações já citadas, apresentaram uma cor marrom amarelado clara na concentração de 0,1 mol, evoluindo para um contraste fosco a 0,5 mol e prata claro a 1 mol. Notamos que, conforme se tem o aumento da concentração utilizada, teremos uma alteração das cores dos extratos.

No que trata o peso das amostras nas primeiras 72 horas, comprovou-se que houve uma pequena variação destas, podendo certa variação está relacionada à interferência do meio físico, variação da balança ou certa associação á ligações químicas formadas pelos gases. Porém, quando calculada a média destes pesos, constatamos certa aproximação dos valores de pesagem diária, conforme apontamento abaixo na Tabela 7.

Tabela 7: Registro de peso da amostra submetida em solução de ácido nítrico nas concentrações de 0,1 vidro I, 0,5 vidro II e 1 mol vidro III.

ÁCIDO NÍTRICO - (HNO ₃) À 0,1, 0,5 E 1 MOL							
PESO TOTAL DIÁRIO							
PESO VIDRO	AMOSTRA	SOLUÇÃO	PESO I	PESO II	PESO III	MÈDIA	
(g)	(g)	(g)	DIA (g)	DIA (g)	DIA (g)	(g)	
VIDRO I	125,95	120,52	271,72	392,24	392,6	392,8	392,5467
VIDRO II	115,31	120,01	294,79	414,8	414,1	414,12	414,34
VIDRO III	141,46	120,56	289,59	410,15	410,2	411,74	410,6967

Fonte: Elaborada pelo autor da pesquisa no laboratório de química orgânica-UNILAB

Os pés de gallus gallus domesticus, quando colocados em solução de ácido acético nas concentrações usadas por esta metodologia, apresentaram coloração clara nas primeiras horas, progredindo para um cobre na concentração de 0,1 mol, amarelo queimado claro em 0,5 mol e siena a 1 mol, podendo ser visualizado determinada características de cor nas respectivas concentrações na Figura 22.

Notou-se que o aumento da concentração do ácido acético levou o clareamento das soluções que estão em contato com os pés de frango. O meio líquido apresenta certa densidade, quando comparado com outros extratos, não contendo odor fétido durante todo o processo. Abaixo segue imagens dos registros desta etapa.

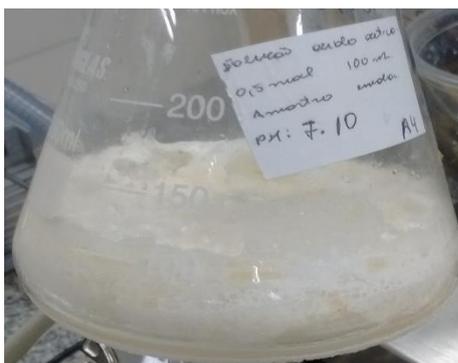
Figura 22- Extrato líquido obtido da solução ácido acética em diferentes concentrações.



Fonte: Elaborada pelo autor da pesquisa no laboratório de química orgânica-UNILAB

Quando tais amostras submetidas ao processo de liofilização expressaram em sua fase final aspecto esbranquiçado em pó conforme visto na Figura 23. Nota-se que o extrato final obtida por esta solução, denota boa quantidade e semelhança com o colágeno hidrolisado padrão de origem bovina encontrado nas farmácias de manipulação e empresas desta finalidade.

Figura 23- Extrato obtido por meio do ácido acético mediante processo de liofilização.



Fonte: **Fonte:** Elaborada pelo autor da pesquisa no laboratório de química orgânica-UNILAB

Sobre o peso das amostra durante às primeiras 72 horas em contato com os pés do frango, contatou-se que ambas as amostras tiveram uma pequena variação no peso, que pode esta relacioando com o meio fisico e calibração da balança. Entretanto, quando calculada a média desses valores, verificamos certa aproximação dos mesmos conforme registro na Tabela 8.

Tabela 8- Registros de peso da amostra submetida em solução de ácido acético ácido nas concentrações de 0,1 vidro I, 0,5 vidro II e 1 mol vidro III.

ÁCIDO ACÉTICO (CH ₃ COOH) À 0,1 0,5 E 1 MOL							
				PESO TOTAL DIÁRIO			
PESO VIDRO	AMOSTRA	SOLUÇÃO	PESO I	PESO II	PESO III	MÈDIA	
(g)	(g)	(g)	DIA (g)	DIA (g)	DIA (g)	(g)	
VIDRO I	119,71	120,16	257,42	377,58	377,77	377,73	377,69
VIDRO II	140,65	120,66	271,29	391,95	391,8	391,42	391,72
VIDRO III	134,2	120,85	284,2	405,05	405,1	405,21	405,12

Fonte: Elaborada pelo autor da pesquisa no laboratório de química orgânica-UNILAB

A terceira forma de extração por aquecimento e pressão dispõe de algumas vantagens quando comparado com outros métodos de extração acima citados, tendo em vista que não necessita do emprego de agentes químicos, que podem influenciar direto e indiretamente em ações que provoquem quadro de intoxicação, irritação, sensibilidade aos componentes químicos.

No que trata aos compostos utilizados para o processo de extração, sabemos que nos métodos propostos de extração de material colagenoso se tem o emprego e utilização de agentes químicos, nos quais, apresenta valor aquisitivo alto e certa restrição para compra, assim como, adequado local para manipulação e manuseio dos mesmos. Porém, a terceira forma de extração é viável devido à utilização de apenas meios físicos em certa quantidade da substância química de H₂O estando em certa quantidade no organismo vivo e sendo um elemento básico e fundamental para a vida humana.

Referente à quantidade de extrato obtido, a terceira forma foi a que apresentou maior quantidade de extrato bruto obtido, no qual este exprime boa consistência e densidade, gerando poucos resíduos no final do processo de extração, o que resulta de forma positiva em maior aproveitamento da matéria prima quando comparado com outros métodos de extração.

Portanto, os pés de frango submetido a este método, após o contato com ambiente refrigerado por cerca de uma hora, dispõem-se à formação de uma estrutura gelatinosa, brilhosa com flexibilidade, denso e viscoso com odor característico da matéria-prima. Sobre temperatura ambiente permanece com tais características de gelatina hidrogel, tendo certas similaridades das características encontradas e descritas na literatura sobre os extratos obtidos de colágeno.

De acordo com Monteiro (2010), quando expressado certo tratamento térmico que venha ser suficiente no meio aquoso/úmido sobre uma matéria-prima que contenha fibras inelásticas de colágeno, acarretará encolhimento desta, gerando o processo de gelatina que é um resultado do processo de dissociação/desenrolamento e desdobramento da tripla hélice da proteína colágeno.

Quando observado o contexto exposto por Monteiro (2010) notamos o terceiro método de extração fez uso de determinado tratamento térmico que pode ter acarretado no encolhimento, quebra e embaraçamento dos componentes ligantes que estão envolvidos na tripla hélice do colágeno, gerando assim a formação de determinada gelatina/hidrogel, tendo em vista a ocorrência da desnaturação e processo físico que as amostras foram submetidas.

O colágeno é a base para a produção da gelatina, sendo esta uma proteína desnaturada derivada, tendo alguns seguimentos para sua produção, consistindo no tratamento da matéria-prima, processo de extração do agente gelatinoso “colágeno”, purificação e secagem, e, quando obtido, poderá ser aplicado em diferentes seguimentos da indústria alimentícia, farmacêutica e cosmética (SILVA et al., 2010).

Já o segundo extrato, em que houve a trituração da matéria-prima, após submetido ao método de aquecimento, pressão, e resfriado, manteve uma consistência rígida, dura, inflexível e maciça de cor acinzentada, em que temperatura ambiente temos o amolecimento e deformação da mesma.

Logo, quando ambos os extratos foram submetidos ao processo de liofilização, o primeiro apresentou característica rígida, densa, forte, brilhosa, esbranquiçada e consistente. Já o segundo extrato manteve aspecto rígido, denso, forte, brilhoso e meio poroso podendo ser vistos tais traços descritos na Figura 24. No que trata do rendimento dos extratos e quantidade de produto final no que envolve conservação, preservando-se em temperatura ambiente sua forma e aspectos descritos acima. Segue abaixo ilustração das amostras obtidas por meio de aquecimento e pressão submetidas ao processo de liofilização.

Figura 24 – Amostras obtidas por meio de aquecimento e pressão submetidas a processo de liofilização.



Fonte: Elaborada pelo autor da pesquisa no laboratório de química orgânica-UNILAB

No entanto, apresentação comercial das gelatinas no mercado geralmente contém uma cor clara, sendo incolor em soluções; mas pode apresentar uma cor amarelada clara ou âmbar escuro “cor de mel escuro”, onde a cor não interfere nas características predominantes do colágeno (SILVA et al., 2010; SIEBERT, 1992; COLE; ROBERTS, 1997).

Quando os extratos foram submetidos à estufa, a uma temperatura de 34 °C por um período de 24 e 48 horas, constatamos que o primeiro extrato encontrava-se em sua forma gelatinosa, passou para o estágio líquido, progredindo para uma estrutura macia, meio resistente, flexível, densa e emborrachada, com cor clara, podendo ser moldado uma forma com certa facilidade, conforme registro na Figura 25.

Tal produto obtido assemelha-se com as placas de hidrocolóide utilizadas em curativos que apresenta certo diâmetro, flexibilidade, podendo ser moldada determinada forma, possuindo agente gelificante. Entretanto a sua utilização fornece um ambiente úmido, protegendo a lesão contra microorganismos externos e auxílio no processo de cicatrização e produção de tecido granulação estimulando angiogênese, tendo como um dos pontos negativos o valor aquisitivo alto (SANTOS, 2017).

Este produto tem demonstrado grande eficiência como recurso terapêutico de lesões ocasionadas em pacientes que permanecem por um curto ou longo período acamados, evitando ou auxiliando no tratamento das lesões com pouco ou moderado exsudato, sendo estas: queimaduras superficiais parcial, úlceras de pressão, feridas pós-

operatórias e alívio da pressão local evitando o surgimento das úlceras por pressão (SOUSA; PIMENTEL; SOUZA, 2017). Mediante produto obtido por meio do método de extração por temperatura e pressão, notamos certa equivalência com elementos que são encontrados na placa de hidrocolóide no que remete a formação de espessura, cor, elasticidade, formação de agente gelificante e proteção. Podendo a mesma apresentar certa aplicabilidade no tratamento de feridas tendo em vista a presença de colágeno em sua estrutura e características semelhantes com outros produtos já conhecidos e comercializados para o tratamento de feridas.

Estudos realizados em seres vivos voltado para o processo de cicatrização de feridas e lesões com placas de hidrocolóide já são conhecidos. À vista disso, o produto obtido mediante o processo de extração desta pesquisa configurou características visuais semelhantes à placa de hidrocolóide, tornando-se importante a realização de novos testes e aprofundamento do mesmo para verificar sua atividade no tratamento e prevenção destas lesões, tendo em vista a matéria prima e seus constituintes.

Já o segundo extrato, quando submetido às mesmas condições do primeiro, notamos que ocorreu o derretimento seguindo para uma estrutura rígida, dura, concentrada, maciça e consistente, visto certo apontamentos na Figura 25, bem como as características do extrato sem ter passado pelo triturado de laminas.

Evidenciamos uma perda de peso das amostras quando comparado o antes e depois de colocar sobre a estufa. Tal fato pode estar relacionado à perda da umidade e permanência de matéria seca, apresentando uma baixa umidade em sua constituição. Segue abaixo ilustração.

Figura 25 - Amostra obtidas por meio de aquecimento e pressão submetidas á estufa.



Primeiro Extrato obtido sem osso



Segundo extrato matéria triturada

Fonte: Elaborada pelo autor da pesquisa no laboratório de química orgânica-UNILAB.

7.2 Teste bacteriológico

Quanto à realização dos testes bacteriológico/microbiológico concebidos com os extratos de ambas as amostras na concentração de 2mg/ml (duas miligramas por mililitro) de solução aquosa, não foi obtido resultado positivo de ação inibitória nos agentes *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Salmonella*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Candida albicans* no período de 24 e 48 horas “vinte e quatro e quarenta e oito” na estufa de crescimento microbiológico, onde certo fato é visto na Figura 26.

Nesse período, obteve o crescimento e cultivo dos microorganismos em ambas as placas de Petris conforme esperado, tendo apenas a aferição da formação do halo pelo elemento controle, que é o antibiótico utilizado para combater o crescimento dos microrganismos, sendo a referência para avaliar o resultado da ação inibitória quando formado o halo em volta das soluções com extratos testados e colágeno padrão.

Logo, os extratos testados em ambos os meios cultivados não demonstram ação inibitória contra o crescimento dos microrganismos usados, tendo apenas a formação do halo do elemento controle que se encontrava no centro destas placas sendo registrado certo resultado na Figura 26. Tanto no método de dissolução dos microrganismo junto ao meio, disco de infusão e poço conforme descrito nos matérias e métodos. Abaixo temos a Figura 26 das placas Petris com os respectivos microrganismos cultivados sem a presença de ação anti microrganismos por parte dos extratos testados após as 48 horas em estufa de cultivo.

Figura 26 - Cultivo em estufa microbiológica e resultados obtidos por meio dos extratos e elemento controle.



Salmonella com Atcc 10708 em poço



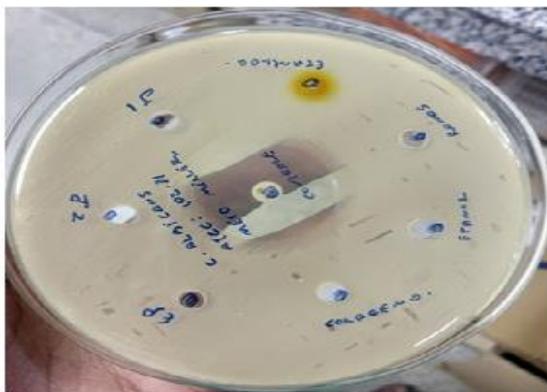
Dissolvido em meio de cultura



Staphylococcus A. Atcc 6538 em poço



Dissolvido em meio de cultura



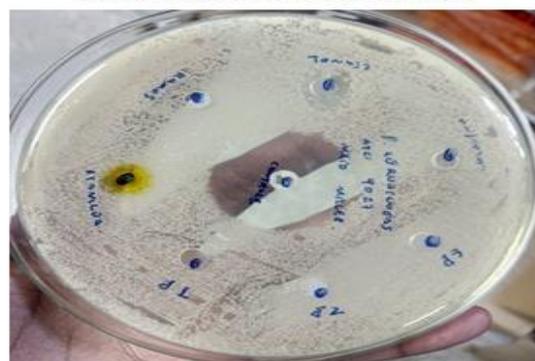
Candida albicans com Atcc 10231em poço



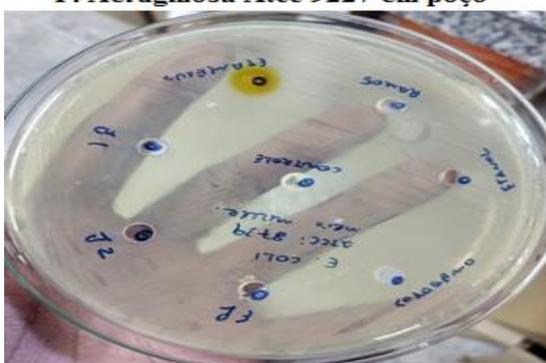
Dissolvido em meio de cultura



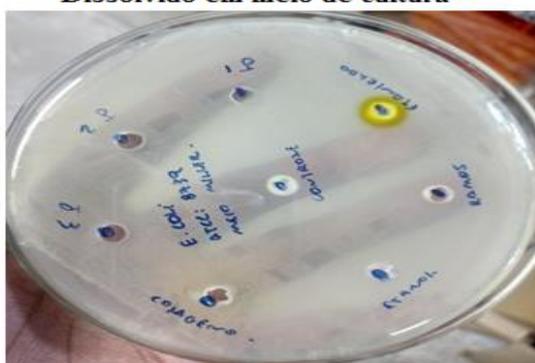
P. Aeruginosa Atcc 9227 em poço



Dissolvido em meio de cultura



.Escherichia coli Atcc 9739 em poço



Dissolvido em meio de cultura



Klebsiella P Atcc 13883 em poço



Dissolvido em meio de cultura

Fonte: Elaborada pelo autor da pesquisa no laboratório de microbiologia-UNILAB.

Mediante pesquisa em base de dados da plataforma ScienceDirect e SciELO por meio das palavras-chave “collagen bacteriological test” e “collagen hydrogel”, não

encontramos artigos que demonstrem atividade antimicrobiana/microbiológica realizada com possível extrato de colágeno e colágeno hidrolisado.

7.3 Espectroscopia de Absorção na Região do Infravermelho (FTIR)

A espectroscopia de absorção de infravermelho constitui um importante método para análise e comprovação da existência dos grupos funcionais de estruturas orgânicas que esteja situado entre 400 a 4000 cm, tendo em vista o movimento das moléculas orgânicas, como angular e axial.

Quando emitido radiação sobre os extratos, poderá ocorrer uma vibração dos átomos e seus grupos de compostos orgânicos, facilitando, assim, a identificação e o registro das bandas. Isso ocorre em cada alteração no nível de energia vibracional, influenciado mudanças em nível rotacional ocasionando a impressão e constituição dos dados e bandas observadas no espectro (LANCELOTTI, 2014; PRABAVATHI; NILUFER; KRISHNAKUMAR, 2013).

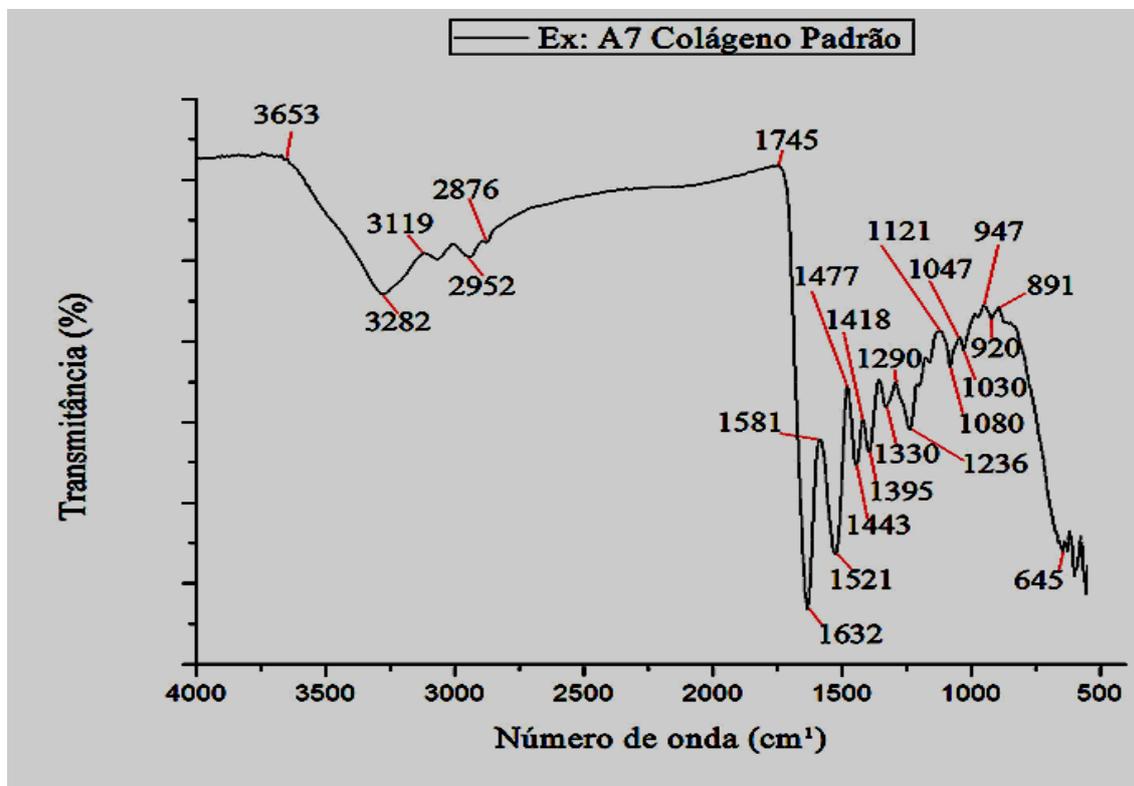
Tendo em vista o intuito deste trabalho de extrair e caracterizar material colagenoso a base de pés de *Gallus gallus domesticus* de ambas as amostras com auxílio do método de Espectroscopia de Absorção na Região do Infravermelho (FTIR), este auxiliará significativamente no reconhecimento e identificação dos picos e suas bandas específicas que caracteriza e reconhecer a presença do colágeno em ambas as amostras. Atentaremos à identificação destes agrupamentos a fim de atingir os objetivos deste trabalho, tendo como padrão o colágeno hidrolisado que é comercializado em farmácias de manipulação e comércios desta natureza.

As amostras submetidas para este teste foram: A1 extrato mediante aquecimento e pressão com osso liofilizado, A2 extrato mediante aquecimento e pressão com osso em estufa, A3 extrato ácido acético liofilizado a 1 mol, A4 extrato mediante aquecimento e pressão liofilizado, A5 extrato mediante raspa de hidróxido de sódio a 1 mol, A6 extrato ácido nítrico, e A7 colágeno padrão hidrolisado.

No espectro de infravermelho do extrato A7 “colágeno padrão” ilustrado na imagem abaixo, observou a presença de grupos funcionais entre os intervalos de 400 cm¹ á 4000 cm¹ que combinam no processo de caracterização desta proteína no reconhecimento de grupos funcionais de amidas I, II e III. Constituindo um gráfico representado pela Figura 27 e desenvolvimento da Tabela 9 com os respectivos valores

das bandas de infravermelho que caracteriza os grupos funcionais do colágeno e suas atribuições que foram identificadas no extrato do colágeno padrão.

Figura 27 - Espectroscopia de infravermelho – FTIR para do colágeno hidrolisado



Fonte: elaborada pelo autor da pesquisa obtida em laboratório de polímeros da UFC.

Tabela 09: Principais grupamentos observados no espectro de infravermelho –FTIR do colágeno hidrolisado.

Região	Número de Onda (cm ¹)	Atribuições
Amida III	1082	Estiramento C-O
	1240	C-N
Amida ciclica	1745	C=O
Amida II	1330	Deformação de C-H(CH ₂)
	3113	
Amida I	1632	C=O de amidas
Aril Alquil	1445-1584	C—C
Amina		
Alquil-Amina	1031	C-N
Amida A	3008	NH
	1630	estiramento C-O

Fonte: elaborada pelo autor da pesquisa.

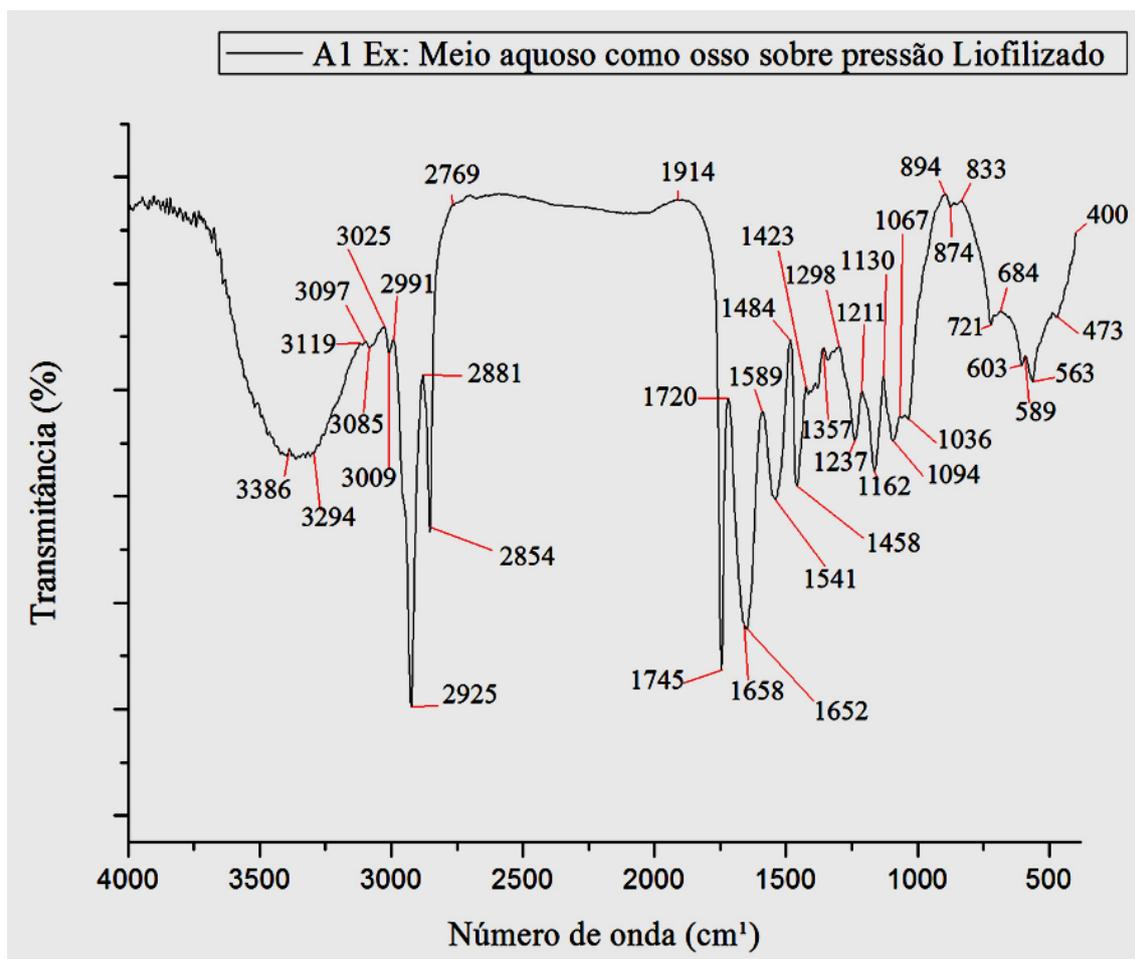
Os picos registrados fazem parte do processo de identificação da estrutura do colágeno, tendo em vista o comprimento de onda de 1745 cm^{-1} confirma a formação de ligação de hidrogênio entre o estiramento NH, C ou O que remete o aminoácido glicina (Gly), sendo responsável pela introdução da tripla hélice, bem como tal aminoácido se caracteriza por esta estar presente no colágeno (LIU et al., 2012).

As amidas II dispõe no processo de combinação da vibração de flexão N-H estando acoplada a vibração de alongamento do C-N, onde valores de comprimento de onda abaixo que refere amida I e II caracterizam a existência de fortes ligações de hidrogênio na estrutura do colágeno. Quanto maior a ligação de hidrogênio na estrutura helicoidal tripla, maior poder estrutural de colágeno, porém diferenças de absorções de onda pode esta atribuída às diferentes estruturas moleculares desta proteína (HASHIM; RIDZWAN; BAKAR, 2014).

Contudo a presença dos grupos funcionais da amida no extrato A7 do colágeno padrão hidrolisado, mantendo uma correlação entre os valores encontrados e achados de pesquisas desta natureza, ajudando assim no processo de caracterização desta proteína. No entanto, usaremos como base de referência estes valores a fins de comprovar existência dos grupos funcionais do colágeno das outras amostras/extrato mesmo por ser de diferente matéria prima.

O espectro de infravermelho da amostra A1, obtida dos pés de *gallus gallus domesticus* mediante aquecimento e pressão passado por triturado, e submetida ao processo de liofilização, foi constituída a Figura 28 com o número de onda e seus picos que define os grupos funcionais da proteína do colágeno ajudando na sua análise e caracterização da amostra. Já na Tabela 10 encontra-se as atribuições dos principais e os principais comprimento de ondas de define a presença da amida e seus grupos funcionais.

Figura 28 - Espectroscopia de infravermelho – FTIR para amostra A1 extrato mediante aquecimento e pressão com osso liofilizado.



Fonte: elaborada pelo autor da pesquisa.

Tabela 10 - Principais grupamentos observados no espectro de infravermelho –FTIR da amostra A1 extrato mediante aquecimento e pressão com osso liofilizado que envolva grupos funcionais de colágeno.

Região	Número de Onda (cm ¹)	Atribuições
Amida III	1094	Estiramento C-O
	1237 - 1745	Deformação angular de grupos N-H acoplado com estiramento de grupos C-N
Amida ciclica	1745	C=O
Amida II	1458	Deformação de grupos C-H
	1541	N-H
	1552	Deformação de grupos N-H acoplado com estiramento de grupos C-N

	3119	Deformação angular de N-H (60%) com estiramento da ligação C-N (40%)
Amida I	3085 e 3097	N-H Amida Primária
	1658	Estiramento de grupos C=O
Aril Alquil Amina	1357	N-H
Alquil-Amina	1036	C-N
Amida A	3009	NH
	1636	Estiramento C-O
Amida B	2925	Estiramento assimétrico de grupos CH ₂

Fonte: elaborada pelo autor da pesquisa.

Neste espectro de absorção no infravermelho é possível identificar vários números de ondas que refere aos grupos amida do tipo I, II, III específico do colágeno, bem como outros grupos funcionais que estão tabelados acima. A banda de absorção encontrada em 2925 cm⁻¹ que corresponde o estiramento do grupo CH, assim como na banda de 1094 cm⁻¹ de forte intensidade devido ao estiramento da ligação C-O. No que trata a presença de amida do tipo I, encontramos as principais bandas 1658 cm⁻¹ sendo típico deste grupo devido ao estiramento de grupos C=O.

Tal espectro nos revelou a presença da amida II no comprimento de onda 1541 cm⁻¹ e 1552 cm⁻¹, onde se tem uma deformação dos grupos N-H acoplado com estiramento de grupos C-N, tendo em 3119 cm⁻¹ deformação angular de N-H (60%) com estiramento da ligação C-N. A amida III é encontrada no registro de onda em 1094 cm⁻¹ que direciona no processo de estiramento C-O, e 1237 cm⁻¹, 1745 cm⁻¹ temos uma deformação angular de grupos N-H acoplado com estiramento de grupos C-N.

Segundo Júnior (2008), bandas em 1420 cm⁻¹ refere uma deformação angular no CH se assemelhando a uma tesoura, que remete a estrutura do colágeno. Com isso, observamos impressão de tal pico em 1423 cm⁻¹ deste extrato, mantendo assim certa correlação como contexto já preposto e conhecido em literatura.

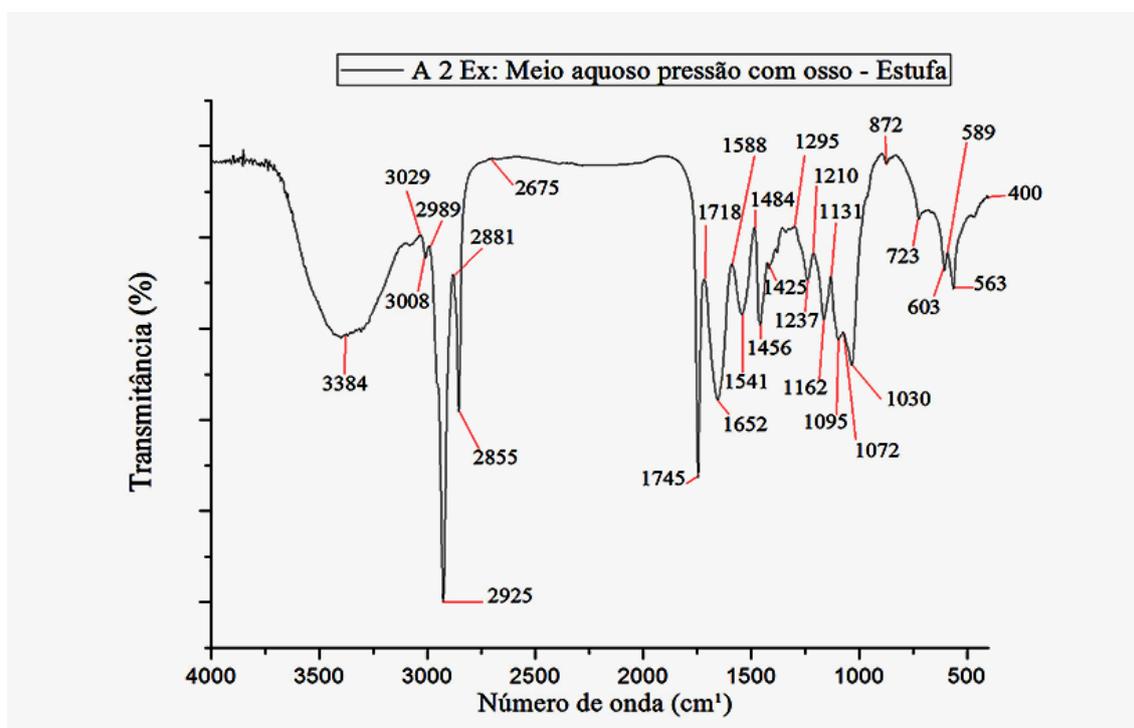
O registro das bandas da amida I que dispõe uma frequência vibracional nos intervalos de 1600-1700 cm⁻¹ está relacionado ao processo de estiramento do grupo de carbonila na estrutura polipeptídica, representando um dos marcadores sensíveis da estrutura secundária da proteína de colágeno, sendo observado em 1659 cm⁻¹. Com este dado obtemos a confirmação da formação de ligações de hidrogênio entre os

estiramentos N-H (posição X) e grupo C=O (Glicina), remetendo no processo de iniciação da tripla hélice do colágeno (SINGH et al., 2011).

Quando observada a presença de bandas de amida II que estão entre os intervalos de 1515 – 1570 cm^{-1} , correlaciona-se a uma deformação de grupo N-H acoplado com o estiramento de grupo C-H, no qual em nosso extrato encontramos em 1552 cm^{-1} (LIU et al., 2014). Porém, a banda identificada em 1458 caracteriza o processo de deformação entre os grupos C-H que se encontra no anel pirrolidínico da prolina e hidroxiprolina, que são aminoácidos característicos do colágeno (VEERURAJ et al., 2015).

A espectroscopia de absorção no infravermelho da amostra A2 extrato por aquecimento e pressão submetido ao triturador com osso e encaminhado a estufa, é impresso na Figura 29 abaixo juntamente com a Tabela 11, dispondo informações a respeito das absorbâncias e seus comprimentos de ondas que caracteriza a presença de amidas.

Figura 29 - Espectroscopia de infravermelho – FTIR para amostra A2 extrato por meio aquoso com osso submetido em pressão e estufa.



Fonte: elaborada pelo autor da pesquisa.

Tabela 11- Principais grupamentos observados no espectro de infravermelho –FTIR da amostra A2 extrato por meio aquoso com osso submetido de pressão e estufa e principais grupos funcionais que remete o colágeno.

Região	Número de Onda (cm ¹)	Atribuições
Amida III	563 – 603	Estiramento do esqueleto
	1237	Deformação angular de grupos N-H acoplado com estiramento de grupos C-N
	1094	Estiramento C-O
Amida ciclica	1745	C=O
Amida II	1458	Deformação de grupos C-H (CH ₂)
	1552	Deformação de grupos N-H acoplado com estiramento de grupos C-N
Amida I	3292 e 3384	N-H
	1658-1652	Estiramento C=O/ligação de H acoplado com COO
Aril Alquil Amina	1357 -	N-H
Alquil-Amina	1036 - 1036-1237	C-N
Amida B	2925	Estiramento assimétrico de CH ₂
Amida A	3009	NH

Fonte: elaborada pelo autor da pesquisa.

Conforme os resultados obtidos mediante análise do espectro para esta amostra, é evidente a presença das bandas de amina I em 1658-1652 cm¹ e o estiramento C=O e ligação de H acoplado com COO. Já na amida II, encontramos a deformação do C-H (CH₂) em 1458 cm¹, e deformação do grupo N-H estando acoplado com estiramento de grupos C-N em 1552 cm¹. Correspondendo às vibrações da amida III em virtude da deformação angular de grupos N-H acoplado com estiramento de grupos C-N em 1237 cm¹, e estreitamento sofrido em C-O no comprimento de 1094 cm¹.

O processo de extração de gelatina de pés de frango por meio ácido desenvolvido por Almeida et al. (2012) tem amida I em 1652 cm¹, amida II em 1539 cm¹, amida III 1241 cm¹, amida B 2932 cm¹ e amida A 3399 cm¹. O processo de absorção da amida I é uma vibração de alongamento acoplada ao COO, e amida II é por

meio de uma combinação do alongamento do C-N, tendo um processo de deformação no NH no plano do grupo peptídico.

A amida III está presente nas 1220-1320 cm^{-1} , associando-se no processo de deformação N-H e estiramento do C-N. Assim como, os picos de absorção do infravermelho em torno de 1450–1451 cm^{-1} , também encontrados neste extrato, refere-se a uma vibração do anel de pirrolidina da polina e hidroxiprolina, sendo específicas para o colágeno (MUYONGA, 2004).

A impressão de valores espectrais de infravermelho entre a faixa de 1200-1300 cm^{-1} caracteriza-se por ser uma marca digital única da composição e organização molecular do colágeno concebido a formação sequencial tripéptica de glicina - Gly, prolina - Pro e hidroxiprolina - Hyp (HASHIM; RIDZWAN; BAKAR, 2014).

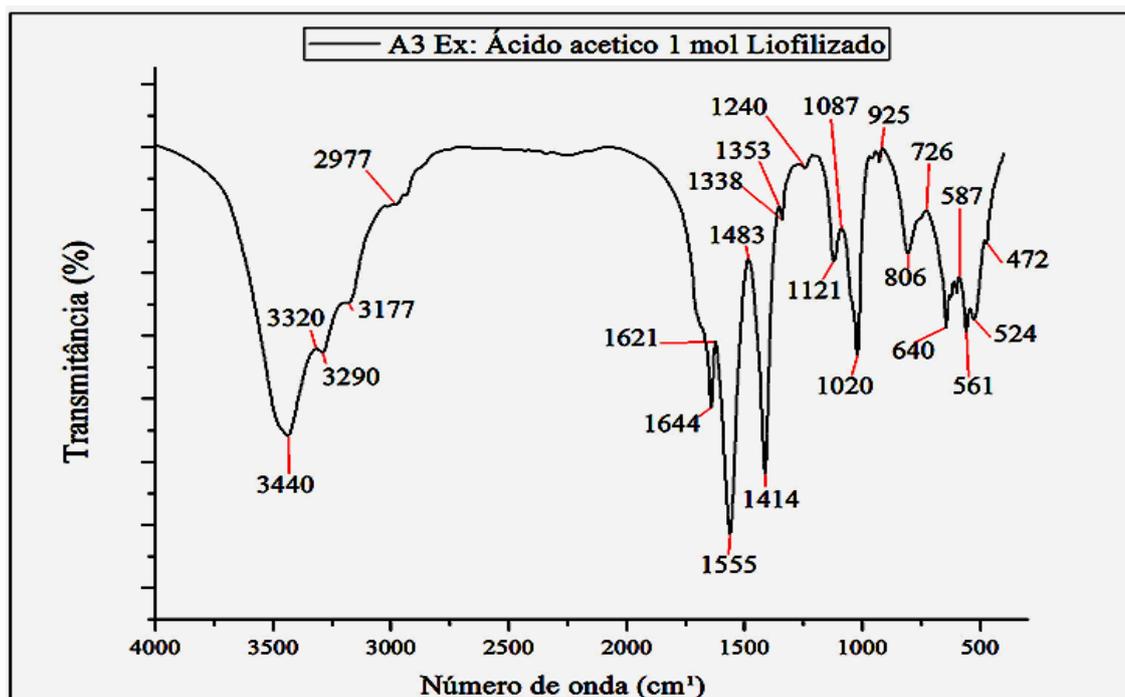
Os espectros de FTIR da matriz de colágeno de porcino apresentam picos fortes entre os valores 1634 – 1550 cm^{-1} nas bandas de amida I, e o colágeno de pés de pato mostrou picos de amida I e II mais amplas (1628-1550 cm^{-1}). Porém, quando comparado com de porcinos, dispor, uma pequena diferenciação dos mesmo no processo de caracterização dos grupos de amida e estrutura do colágeno. Certa variação pode manter correlação com as diferenças estruturais da matéria prima utilizada, processo de extração e metodologia aplicada no estudo, não sendo exato os valores quando comparados dos tipos estudos acima (KIM et al., 2014).

Para a amostra A3 extrato ácido acético liofilizado a 1 mol, quando submetidos ao teste de espectroscopia de infravermelho, são exibido picos característicos de amida do tipo I em 1621 cm^{-1} e 3290 cm^{-1} associado ao alongamento de N-H. A presença da amida II em 1338 cm^{-1} ocorre a deformação do C-H (CH_2) e estiramento do COO em 1414 cm^{-1} seguindo para deformação N-H acoplado com estiramento C-N. Na amida III observamos em 561 cm^{-1} um estiramento do esqueleto estrutural, seguindo para 1087 cm^{-1} de C-O e sofrendo uma deformação angular N-H acoplado com estiramento de grupos C-N entre 1237-1240 cm^{-1} . A amida A é localizada na região 3440 cm^{-1} onde notamos alongamento do N-H, segue abaixo a Figura 30 e a Tabela 12 com os respectivos grupos funcionais que caracteriza colágeno.

A amostra A3 deriva dos pés de gallus gallus domesticus com base no segundo método de extração da solução de ácido acético a 1 mol submetido ao processo de

liofilização. Sendo impresso gráfico com identificação dos grupos funcionais que direciona a presença da amida na Figura 30. E sendo constituído á tabela 12 para melhor interpretação destes grupos funcionais com suas atribuições e comprimento de onda que refere colágeno.

Figura 30 - Espectroscopia de infravermelho – FTIR para amostra A3 extrato ácido acético liofilizado a 1 mol.



Fonte: elaborada pelo autor da pesquisa.

Tabela 12: Principais grupamentos observados no espectro de infravermelho – FTIR da amostra A3 extrato ácido acético liofilizado á 1 mol com seus principais grupos funcionais que remete o colágeno.

Região	Número de Onda (cm ¹)	Atribuições
Amida III	561	Estiramento do esqueleto
	1087	Estiramento C-O
	1237	Deformação angular de grupos N-H acoplado com estiramento de grupos C-N
Amida II	1338	deformação C-H (CH ²)
	1414	Estiramento COO

	1555	Deformação N-H acoplado com estiramento C-N
Amida I	3290	N-H
	1621	C=O de amidas
Amida A	3440	Alongamento N-H

Fonte: elaborada pelo autor da pesquisa.

A identificação e caracterização de picos de absorção para amida A em colágeno está comumente associada a uma vibração de alongamento da estrutura N-H que transcorre entre os intervalos de número de onda de 3400-3440 cm^{-1} . No entanto, é vista a presença de banda em torno de 3290 cm^{-1} , que pode remeter ligações de hidrogênio acoplado a grupo N-H (GAO et al., 2018).

São reconhecidos valores de absorbância na amida I que remetem a estruturas secundárias na forma de alfa hélice entre 1645-1659 cm^{-1} , acreditando-se mediante resultados obtidos da espectroscopia de colágeno provindo do osso de ovelha dispõem desta esta alfa-hélice. Assim como também as variações ocorridas entre as bandas de 1550 – 1600 cm^{-1} designada de amida II configuram uma vibração de flexão N-H de (40-60 %) acopladas as vibrações de estiramento C-N (18-40 %) (JEEVITHAN et al., 2014).

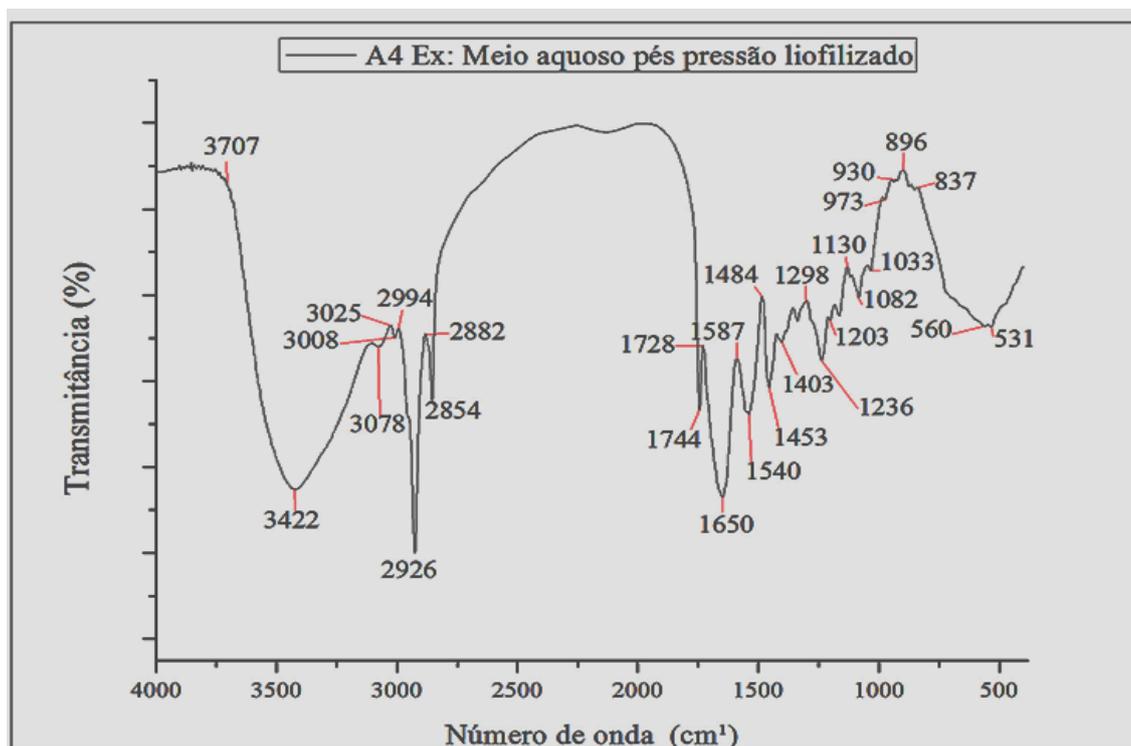
Os picos de amida II do colágeno controle são observados 1548-1559 cm^{-1} , para o colágeno sorbitol e filmes de colagénio-glicerol em 1552 cm^{-1} e colágeno GTA, filme de colágeno de HMDCA e colágeno-TG; e a 1529 cm^{-1} . No entanto, os modos de vibração destas amidas são atribuídos internamente ao N-H curva de (40-60%) e às vibrações de alongamento C-N (18- 40 %) (KONG; YU, 2007).

A presença dos picos de amida III situa-se em torno do número de onda de 1240 cm^{-1} do colágeno padrão, onde este valor varia para as diferentes amostras de colágeno sorbitol, colágeno glicerol, filme de colágeno, colágeno com HMDC permanecendo em torno 1238-1242 cm^{-1} . Tais picos caracterizam a curva do plano de N-H e C-N, tendo alongamento das vibrações das ligações de amida, bem como absorção das vibrações de grupos CH₂ do espiral da glicina e cadeia lateral da prolina (ELANGO; BU; BIN, 2017).

Para a amostra A4 provinda do terceiro medoto de extração sendo apenas o extrato que não passou pelo triturado, sendo submetidos ao processo de liofilização.

Sendo encontrado neste os agrupamentos de amidas I, II e III bem definidas conforme Figura 31 e Tabela 13 com principais grupos funcionais e atribuições encontradas nesta amostra.

Figura 31 - Espectroscopia de infravermelho – FTIR para amostra A4 extrato de meio aquoso somente de pés submetidos ao processo de liofilização.



Fonte: elaborada pelo autor da pesquisa.

Tabela 13: Principais grupamentos observados no espectro de infravermelho –FTIR da amostra A4 extrato de meio aquoso somente de pés submetidos ao processo de liofilização.

Região	Número de Onda (cm ¹)	Atribuições
Amida III Amida ciclica	1236	Deformação angular de grupos N-H acoplado com estiramento de grupos C-N
	1020-1030	C-O-H
	1080	PO ₂
	1744	C=O
Amida II	1453	Deformação de grupos C-H
	1560-1500	Deformação de grupos N-H acoplado com estiramento de grupos C-
	1550	N

Amida I	1650	Estiramento C=O
Alquil-Amina	1203	C—N
Amida B	2916	Estiramento assimétrico de grupos CH ₂
Amida A	3008 -3400-3440	NH

Fonte: elaborada pelo autor da pesquisa.

Para a amostra A4 encontramos a presença dos grupos de amida do tipo I em 1550 cm⁻¹, onde ocorre o estiramento do C=O da estrutura secundária de proteína na alfa—hélice. Já na amida II, teremos a deformação de grupos C-H em 1453 cm⁻¹ sendo de forma simétrica e anti-simétrica do CH₂, bem como, 1500-1560 cm⁻¹ ocasionando a deformação do grupo N-H tendo o seu dobramento acoplado com estiramento do grupo C-N. A amida III no comprimento de onda 1236 cm⁻¹ sofre uma deformação angular de grupos N-H acoplado com estiramento de grupos C-N, em 1033 cm⁻¹ tem a deformação do glicogênio e 1080cm⁻¹ de PO₂ acarretando o estiramento. Caracterizando assim os grupos funcionais de amida.

As vibrações que envolvem os grupos de amida correlacionam as ligações C=O, N-H e C-N, sendo estas ligações peptídicas de estruturas secundárias das proteínas. As bandas encontradas de amida II são resultado do arranjo fora de fase de flexão de N-H do plano, bem como o estiramento C-N, Flexão C-O, estiramento C-C e N-C de ligações peptídicas da estrutura proteica. Já os grupos encontrados para amida I são reconhecidos pelo estiramento do C=O das ligações peptídicas das quais são modulados a estrutura secundária da alfa hélice e conformação de folha beta do que trata o colágeno (CASTRO, 2018).

O valor encontrado da amida I do colágeno provindo de pele de sapo-boi foi na banda de 1653 cm⁻¹, no qual ficou entre a faixa de 1650-1655 cm⁻¹ dos picos registrados e outros colágenos, sendo confirmada a estrutura helicoidal em “forma de hélice” do colágeno por meio da absorvância entre 1235 cm⁻¹ constituída no espectro.

No que trata da amida III encontrou-se em torno de 1450 cm⁻¹, sendo um valor de referência para resultados iguais ou aproximados a este. O aparecimento da amida A está associado à frequência de alongamento sofrido entre N-H em torno de 3400-3440 cm⁻¹. Porém, quando este agrupamento estiver ligado a hidrogênio, pode apresentar deslocamento para uma frequência geralmente em 3300 cm⁻¹ (LI et al., 2004).

Os grupos funcionais correspondentes ao colágeno por meio da espectroscopia de infravermelho envolvem a presença de amida do tipo A, B I, II e III. Tendo as bandas de pico de amida I em torno de 1650-1665 cm^{-1} com atribuição C-O, amida II 1530-1550 cm^{-1} - N-H e C-N. Amida A em torno de 2225-2200 cm^{-1} -N-H, para amida III dispõe os picos de 2925 cm^{-1} para grupo funcional de CH₃, 2924 cm^{-1} para CH₂ e 1239 e para amida B em torno de 3080 cm^{-1} (LEÓN-MANCILLA et al., 2016).

Onde na amostra A4 encontramos os grupos e valores do comprimento de onda semelhantes com resultados de outras pesquisas que envolvem extração e caracterização de colágeno. Temos o registro da amida I em 1650 cm^{-1} , sendo tal pico descrito na literatura a confirmação da estrutura helicoidal em forma de hélice, assim como o registro do comprimento de onda de 1744 cm^{-1} da amostra A4, estando bem próximo ao que foi encontrado por Liu et al (2012) em 1745 cm^{-1} , que confirma a presença da ligação de hidrogênio com o estiramento NH ou C, configurando a existência do aminoácido de glicina (GLY) encontrada na estrutura do colágeno.

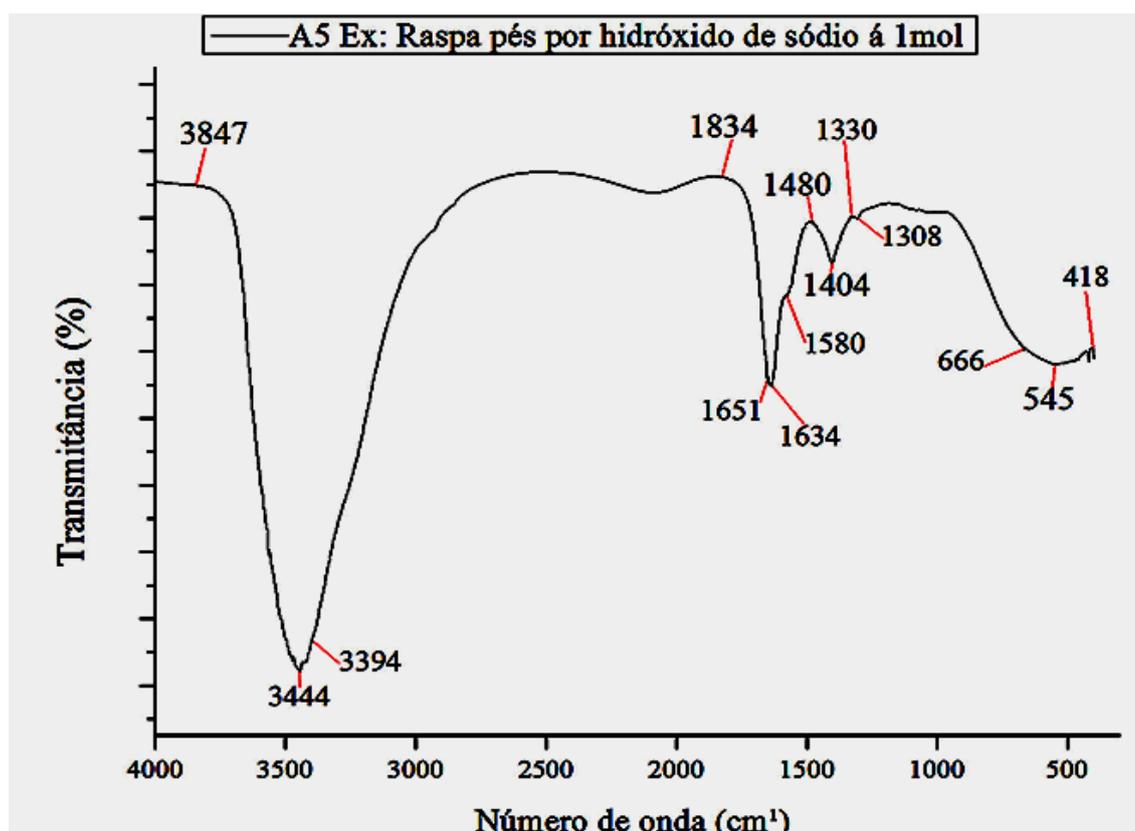
Amida III é registrada na amostra A4 em torno de 1237 cm^{-1} o que refere a uma deformação angular dos grupos N-H acoplados com o estiramento de grupos C-N que representa o encurvamento dos planos N-H e C-N com alongamento das vibrações dos grupos de amida e absorção do CH₂ destinando o processo em espiral da glicina e cadeias laterais da prolina na estrutura do colágeno. No qual tal pico é encontrado entre os comprimentos de onda 1238-1242 encontrados por ELANGO; BU; BIN (2017), e estando próximo aos valores vistos do colágeno padrão com comprimento de amida III em 1240 cm^{-1} .

Os comprimentos de onda referente aos grupos funcionais de amida I, II e III são todos encontrados na Figura 31, estando com os valores que remete os grupos funcionais do colágeno iguais ou próximos dos valores encontrados por pesquisadores que identificaram colágeno de outras fontes de extração. No entanto, certos achados dos grupos funcionais e semelhança da estrutura dos gráficos dispõe fortes indícios das amostras compreenderem colágeno do tipo I.

Na amostra A5 de extrato de raspa de pés de frango por hidróxido de sódio a 1 mol do segundo método de extração utilizado, vista na Figura 32. É encontrado os grupos de amida I em torno do pico de 1551-1634 cm^{-1} ocorrendo o estiramento do grupo funcional de C=O que dispõe um dos marcadores da proteína colagenosa

conforme á estrutura secundaria do colágeno. Para amida II registou-se no comprimento de onda em 1336/1480 cm^{-1} , constituindo tendo deformação do C-H para formação da tríplice helice colágeno. Para amida A em 3444 cm^{-1} temos o alongamento do N-H e em 1634 cm^{-1} mediante o estiramento do C-O. Eventuais registros estão apresentados na Figura 32.

Figura 32- Espectroscopia de infravermelho – FTIR para amostra A5 extrato de raspa de pés de frango por hidróxido de sódio a 1 mol



Fonte: Elaborada pelo autor da pesquisa.

Conforme observado os resultados e discursões das amostras, é evidente á presença dos agrupamentos de amida e seus picos em todos os extratos, configurando assim uma estrutura proteica do colágeno nas amostras.

Notamos que os extratos A1, A2 e A4 expressa em seus resultados de espectroscopia de infravermelho todos os picos que define os agrupamentos de amida I, II e III de forma bem evidente, caracterizando assim a presença dos elementos constituintes da estrutura do colágeno e sua tripla hélice. Onde alguns valores dos grupos funcionais das amidas são iguais ou aproximados aos valores descritos em estudos

que trataram sobre processo de extração, caracterização e confirmação da presença de colágeno do tipo I extraídos de outras fontes animais.

Assim como, os espectros de infravermelho das amostras A1, A2 e A4 compreenderam a presença de grupos mas definidos para amida e maiores quantidade de registros de picos. Preservando assim a existência dos grupos funcionas específicos do colágeno independentemente do tratamento que ambas as amostras acima foram submetidas. Ressaltamos que obtenção destas amostras acima, foi através do terceiro método de extração, sendo este mais viável quando comparado com os outros métodos utilizados por esta pesquisa.

E quando comparado os resultados obtidos por estas amostras com o colágeno padrão é visto certa paridade da constituição dos gráficos, porém as amostras A1, A2 e A4 constituem mais definidamente os picos dos grupos de amida e elementos constituintes da estrutura do colágeno destacando-se, quando comparado com o resultado obtido do colágeno padrão.

Nos extratos A3 encontramos os agrupamentos de amida, no qual os resultados obtidos neste extrato são similares ao colágeno padrão mais não superior ao mesmo quando observado a presença dos grupos funcionas, constituição do gráfico. Já no extrato A5 não é bem definido e apresentado na amostra os grupos funcionais de amida I, II e III, mais alguns grupos funcionais que caracteriza o colágeno é encontrado nesta amostra tendo como padrão o colágeno hidrolisado.

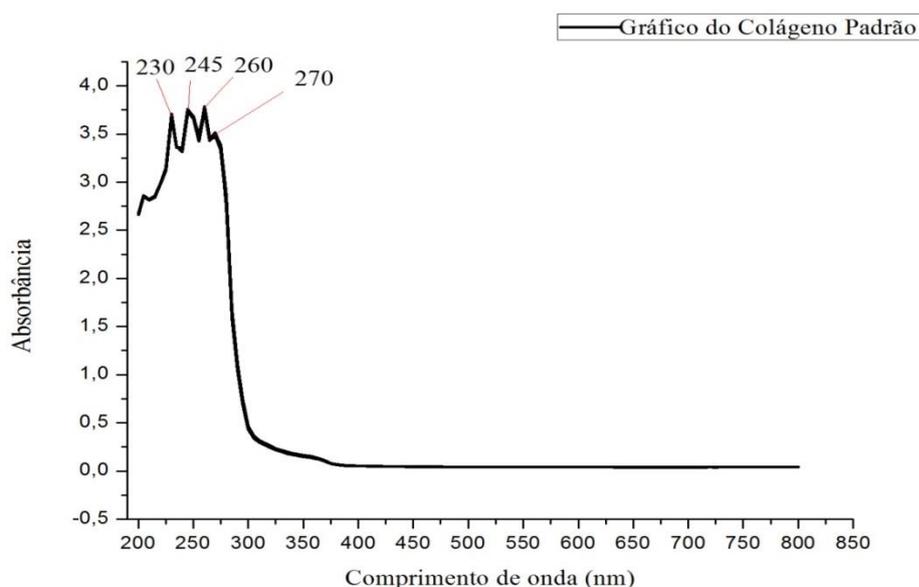
Concluimos que todos os processos de extração foram satisfatórios, tendo em vista o objeto de pesquisa deste estudo que envolve extração e caracterização de material colagenoso com auxílio espectroscopia de infravermelho para reconhecimento dos grupos funcionas da amida. Notamos que as amostras A1, A2 e A4 representa os agrupamentos funcionais do colágeno, se destacando do colágeno padrão em alguns aspectos já citados no decorrer deste estudo. No entanto, todos os extratos contêm tais grupos funcionais que caracteriza o colágeno, apresentado valores iguais ou aproximados dos seus comprimentos de onda e pico quando comparado com os achado nos estudos desta natureza.

7.4. Espectroscopia UV-visível de colágeno

Esta análise por meio de espectroscopia de absorção UV-VIS foi realizada com intuito de observar os valores de absorbância da amostra padrão de colágeno e comparar seu respectivo resultado com ambas as amostras extraídas. Esta é uma técnica utilizada para avaliar a purificação de proteína.

Na Figura 33 acima é possível observar a formação de um pico de 230nm até 270nm que remete a característica do colágeno do tipo I, sugerindo formação dos grupos CO, CONH₂ e COOH que estão acessíveis nas cadeias polipeptídicas da proteína de colágeno (VEERURAJ et al., 2015).

Segue abaixo a **Figura 33** –Espectro de absorção UV-VIS do colágeno padrão hidrolisado que é comercializado.



Fonte: elaborada pelo autor da pesquisa laboratório de polímero UFC.

Sabe-se que os aminoácidos tirosina, fenilalanina e triptofano apresentam alta afinidade de coeficiente de absorção molar na região do espectro UV-VIS entre 200-400 nm, onde a absorbância de 280 nm pode ser aplicada no acompanhamento de purificação das cadeias de proteínas aromáticas dos aminoácidos acima descritos (SANTOS, 2017). De acordo com pesquisas realizadas, os grupos substituintes de compostos aromáticos, amins primárias e secundárias e carboxilas mantêm absorção entre $230 < a_{max} < 280$ nm, assim como ausência do triptofano em sua estrutura (PAVIA; LAMPMAN; KRIZ, 2010).

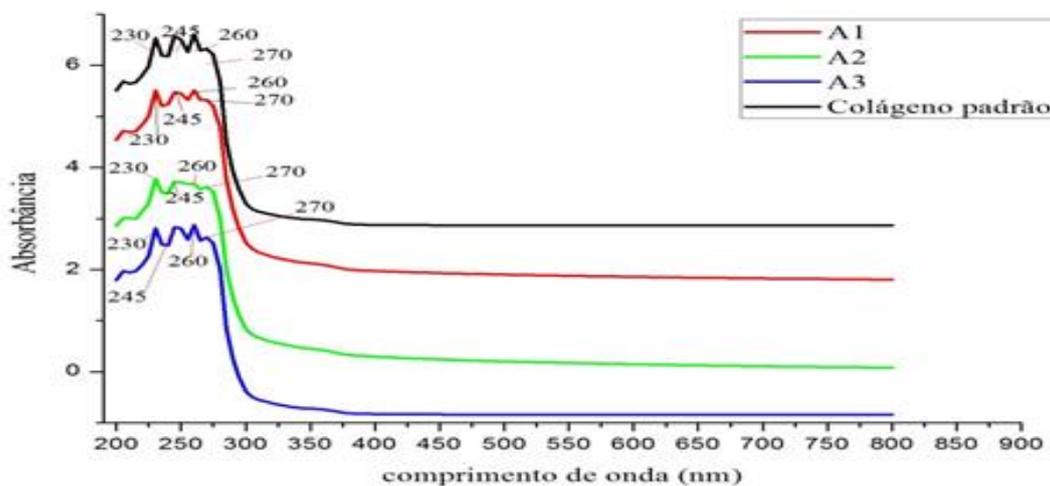
Há também formação de picos de comprimento de onda registrando 245 nm, 260 nm e 274 nm, não excedendo o valor de onda a partir de 280° nm, remetendo assim, o grau de pureza deste colágeno e eficiência do processo de remoção das proteínas não colagenosas em virtude de um bom método de isolamento e extração da proteína (KITTIPIHATTANABAWON et al., 2005; FIGUEIREDO, 2015).

Sabe-se por meios de estudos que as amostras com presença de tirosina e fenilalanina são cromóforos bastante sensíveis, e que absorvem luz abaixo de 300 nm, como é visto em espectros UV-Vis de amostras colagenosas solúveis em pepsina com picos de absorbância em torno de 236 nm a 280 nm não mais que isso (LI et al., 2004).

Mediante análise do Espectro de absorção UV-VIS do colágeno padrão hidrolisado, submetemos a esta análise as amostras dos extratos mediante aquecimento e pressão triturado e liofilizado (A1), extrato mediante aquecimento e pressão sem triturar submetido a estufa (A2), extrato mediante utilização de ácido acético a 0,5 mol liofilizada (A3), ácido nítrico a 1 mol liofilizada (A4), extrato mediante raspa de hidróxido de sódio a 1 mol (A5) e extrato de hidróxido de sódio a 1mol liofilizada (A6).

Como isso na Figura 34, o registro dos gráficos dos extratos juntamente como o espectro do colágeno padrão para verificar possível existência e similaridade no formato, ângulo e picos de comprimento de ondas, conforme imagens abaixo.

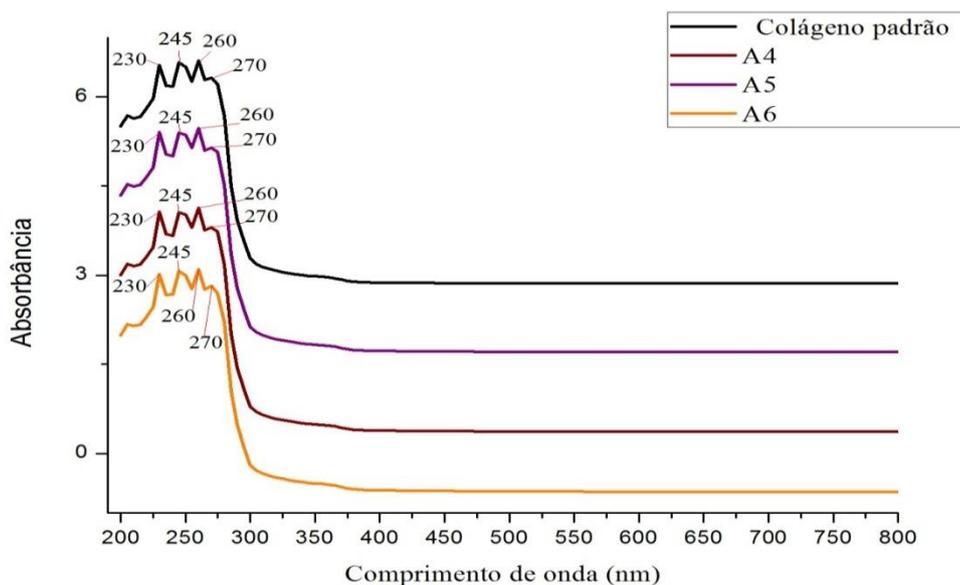
Figura 34 - Espectro de absorção UV-VIS do colágeno padrão hidrolisado e amostras A1, A2, A3.



Fonte: elaborada pelo autor da pesquisa laboratório de polímero UFC.

Na Figura 35 temos a representação gráfica do espectro de absorção UV-VIS dos extratos de ácido nítrico a 1 mol liofilizada (A4), extrato mediante raspa de hidróxido de sódio a 1 mol (A5), extrato de hidróxido de sódio a 1mol liofilizada (A6) e na cor preta o colágeno padrão para avaliar os mútuos picos e desenho gráficos das amostras.

Figura 35 - Espectro de absorção UV-VIS do colágeno padrão hidrolisado e amostras A4, A5, A6.



Fonte: Elaborada pelo autor da pesquisa do laboratório de polímero da UFC.

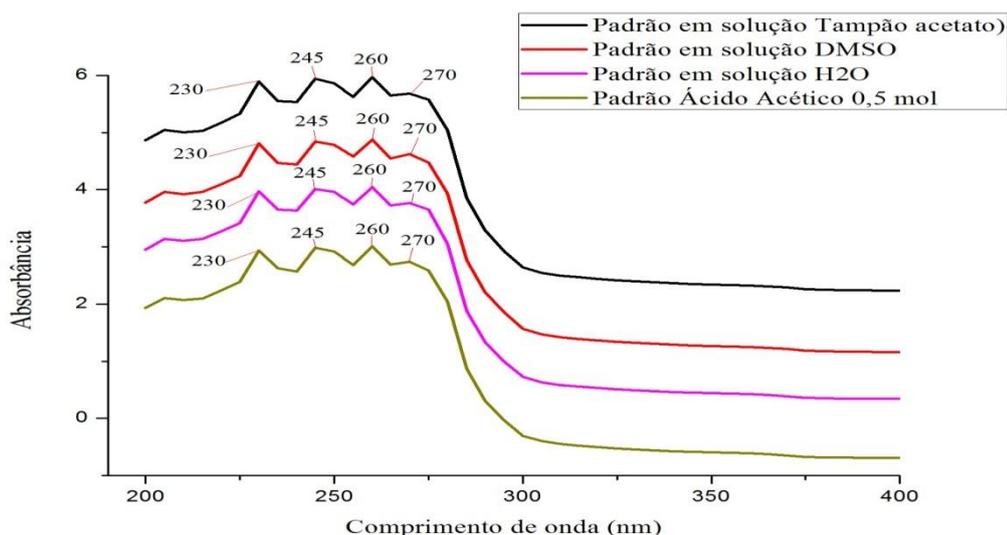
Portanto, após tratamento dos dados no programa OriginPro8 constatamos que os extratos submetidos a este teste denotou familiaridade no desenho dos gráficos, assim como nos comprimentos de onda de 230, 245, 260 e 270 nm e seus picos, não sendo expostos novos eventos após estes valores até a corrida final de 800 nm.

O fato de não ter sido registrada a absorbância após 280 nm remete a uma baixa quantidade de tirosina na molécula de colágeno, pois quando registrado o pico acima de 280 nm poderá representar outros tipos de proteínas. No entanto, os resultados obtidos das amostras confirmam que a proteína recuperada é colágeno, tendo como base os resultados descritos de pesquisa, assim como bom processo de desproteinização da matéria prima utilizada estando os resultados em concordância com os resultados encontrados por Huang et al (2011).

A realização deste teste, utilizou-se o protocolo de Duan et al. (2009) e Li et al. (2004), em que os mesmos referem que a diluição do extrato deve ser em solução tampão de ácido acético e acetato de sódio para um pH 4.

No entanto desenvolvemos o trabalho conforme protocolo acima descrito, assim como, em outras soluções, sendo ácido acético á 0,5 mol, Dimetilsulfóxido – DMSO e solução tampão, Água Milli-Q. Foi realizado o teste em triplicata com intuito de comparar se os diluentes influenciam nos resultados dos gráficos, sendo registrado na figura 36 do espectro de absorção UV-VIS da amostra do colágeno padrão, conforme imagem baixo.

Figura 36 -Espectro de absorção UV-VIS do colágeno padrão hidrolisado diluído em solução tampão, ácido acético a 0,5 mol, Dimetilsulfóxido – DMSO e solução tampão, Água Milli-Q.



Fonte: elaborada pelo autor da pesquisa laboratório de farmacognosia da UFC.

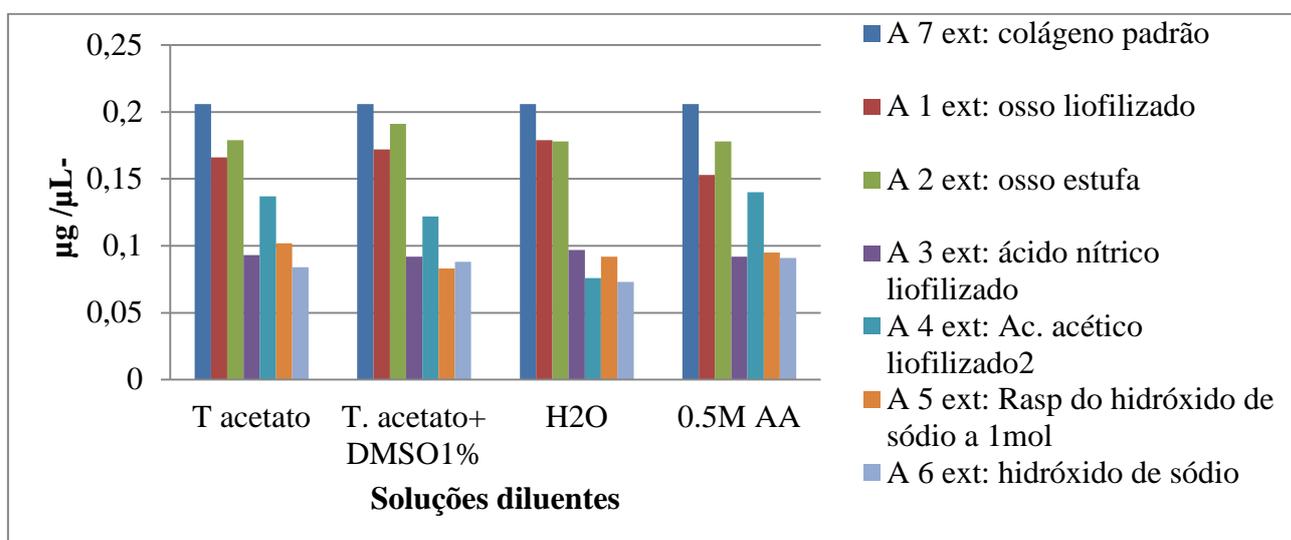
Podemos constatar mediante resultado acima do teste realizado com colágeno padrão que, independente da solução diluente de tal extrato, não houve interferência nos resultados quando observado forma do gráfico, de valores dos picos e ângulos. Foram registrados quatros picos de 230nm, 245nm, 260nm e 270nm, não obtendo a formação de novo pico até o ponto final da corrida de 800nm.

7.5 Quantificação de Proteínas.

Para este teste utilizamos as amostras A1 extrato submetido aquecimento e pressão triturado e liofilizado, A2 extrato submetido aquecimento e pressão triturado submetido a estufa, A3 extrato ácido nítrico liofilizado, A4 extrato de ácido acético liofilizado, A5 extrato da raspagem do hidróxido de sódio a 1mol, A6 extrato de hidróxido de sódio, e A7 colágeno padrão.

Apresentamos na Figura 37 as soluções utilizadas para dissolução dos extratos sendo: Padrão tampão de ácido acético e acetato de sódio para um pH 4, ácido acético a 0,5 mol, Dimetilsulfóxido – DMSO e solução tampão, Água Milli-Q e quantificação de proteína. Sendo realizado este teste em triplicata com o objetivo de identificar o valor total de proteína dos extratos/amostras representado $1 \mu\text{g } \mu\text{L}^{-1}$ conforme gráfico abaixo.

Figura 37 - Gráfico de quantificação de proteínas e soluções diluentes das amostras.



Fonte: Elaborada pelo autor da pesquisa laboratorial de farmacognosia da UFC.

Nota-se que o extrato com maior concentração de proteína final foi a amostra A7 extrato colágeno padrão, que registou valor de $0,206 \mu\text{g } \mu\text{L}^{-1}$ para todas as soluções testadas conforme registro acima, não tendo variação em ambos os valores, o leva a acreditar, que independentemente da solução acima testada, neste extrato não haverá redução na concentração da sua proteína total no caráter de ganho ou perda de seus componentes proteicos, mantendo uma média igual ao valor descrito.

Já o segundo com maior concentração e média de proteína total foi extrato A 2 de osso estufa com $0,191 \mu\text{g } \mu\text{L}^{-1}$ solução de tampão de acetato com DMSO a $0,1 \text{ mol}$, seguindo para tampão acetato com $0,179 \mu\text{g } \mu\text{L}^{-1}$ e mantendo o mesmo valor de $0,178 \mu\text{g } \mu\text{L}^{-1}$ para dissolução em H_2O e ácido acético a $0,5 \text{ mol}$.

Com isso, evidenciamos que este extrato apresentou uma variação de sua concentração proteica mediante soluções utilizadas de cerca $13 \mu\text{g } \mu\text{L}^{-1}$, pois quando observado o valor de maior registro para menor em porcentagem refere aproximadamente 6% (seis por cento), tendo a média de proteína total para este extrato de $0,181 \mu\text{g } \mu\text{L}^{-1}$.

O extrato A1 de osso liofilizado foi o terceiro com maior concentração de proteína total, conforme registro em teste de $0,179 \mu\text{g } \mu\text{L}^{-1}$ quando solubilizado em água, em seguida para $0,172 \mu\text{g } \mu\text{L}^{-1}$ em solução tampão acetato com DMSO a $0,1 \text{ mol}$, progredindo redução deste valor para $0,166$ em solução tampão e $0,153 \mu\text{g } \mu\text{L}^{-1}$ solução de ácido acético a $0,5 \mu\text{g } \mu\text{L}^{-1} \text{ mol}$.

No entanto, a diferença de valores deste extrato foi em torno de $26 \mu\text{g } \mu\text{L}^{-1}$ que representa em porcentagem cerca de catorze por cento (14%). Pode ocorrer esta redução devido ao processo de homogeneização das amostras nas soluções usadas. A média registrada de proteína total foi $0,167 \mu\text{g } \mu\text{L}^{-1}$.

A quarta maior concentração de proteína total foi na amostra A 4 extrato ácido Acético liofilizado $0,140 \mu\text{g } \mu\text{L}^{-1}$ solubilizado em solução de ácido acético $0,5 \text{ mol}$, seguindo para $0,137 \mu\text{g } \mu\text{L}^{-1}$ na solução tampão acetato, $0,122 \mu\text{g } \mu\text{L}^{-1}$ em tampão acetato com DMSO $0,1 \text{ mol}$ e $0,076 \mu\text{g } \mu\text{L}^{-1}$ em meio aquoso. Neste extrato, notamos que teve uma redução considerável da concentração de proteína total quando tal extrato foi solubilizado em água, deixando evidente maior afinidade de dissolução desta amostra para um meio ácido.

Mediante análise deste resultado, quando reparado o maior valor registrado para o mesmo, verificamos uma redução da quantidade proteica de $64 \mu\text{g } \mu\text{L}^{-1}$, expressando em porcentagem um valor aproximado de quarenta e seis por cento (46%) de redução deste índice do que trata as soluções diluentes. E, quando calculada a média proteica para amostra A4, foi de $0,119 \mu\text{g } \mu\text{L}^{-1}$.

O quinto extrato A3 de extrato ácido nítrico liofilizado apresentou maior concentração proteica total na solução diluente de meio aquoso, com valor de $0,097 \mu\text{g } \mu\text{L}^{-1}$ e registou valores iguais de $0,093 \mu\text{g } \mu\text{L}^{-1}$ para todos os outros diluentes. Pode-se considerar que independentemente das soluções diluentes, os valores proteicos apresentaram pequena variação e proximidade quando observado maior valor deste extrato. Tendo sua média calculada em $0,094 \mu\text{g } \mu\text{L}^{-1}$.

Subsequentemente, o sexto extrato com maior concentração proteica foi o A 5 das amostras de raspa de hidróxido de sódio a 1 mol, com cerca de $0,102 \mu\text{g } \mu\text{L}^{-1}$ solubilizado em tampão acetato, seguindo para $0,095 \mu\text{g } \mu\text{L}^{-1}$ na solução de ácido acético 0,5 mol, para a solução meio aquoso de $0,092 \mu\text{g } \mu\text{L}^{-1}$ e $0,083 \mu\text{g } \mu\text{L}^{-1}$ em solução tampão de acetato com DMSO 0,1 mol. No entanto, quando calculado o índice de variação da quantidade proteica visando a solução de diluição, constatamos variação em torno de $19 \mu\text{g } \mu\text{L}^{-1}$, quando expressado tal valor em percentagem remete dezanove por cento (19%) de variação. A média de proteína calculada para este extrato ficou em torno de $0,093 \mu\text{g } \mu\text{L}^{-1}$.

O extrato da amostra A 6 hidróxido de sódio foi o que apresentou menor concentração proteica de todos os extratos testados, onde o maior valor quando observado a solução de diluição foi de $0,091 \mu\text{g } \mu\text{L}^{-1}$ em ácido acético a 0,5 mol, seguindo para $0,088 \mu\text{g } \mu\text{L}^{-1}$ em tampão acetato com DMSO a 0,1 mol, em tampão acetato de $0,084 \mu\text{g } \mu\text{L}^{-1}$ e por último $0,073 \mu\text{g } \mu\text{L}^{-1}$ em meio aquoso. Notamos que a diferença do índice proteico variou conforme solução de dissolução utilizada em todo de $18 \mu\text{L}^{-1}$, que representa em percentagem valor aproximado de 20 % do valor total obtido no primeiro meio. A média calculada da quantidade proteica foi de $0,084 \mu\text{g } \mu\text{L}^{-1}$.

A presença de proteína foi registrada em todas as amostras submetidas a este teste, apresentando certa variação dos valores proteicos, que pode manter relação com o processo de dissolução e solubilização dos extratos aos componentes diluentes, tendo em vista que a amostra padrão apresentou o mesmo valor de concentração independente da solução diluente.

Todos os extratos submetidos a este teste apresentaram uma taxa proteica independentemente de ter maior ou menor quantidade quando comparados entre os mesmo. Tal afirmação é comprovada por teste de quantificação de proteína. Durante o processo de manuseio e pipetagem dos reagentes, que por sua vez, quando em contato com proteínas, vai acometer uma mudança na coloração de amarelo/castanha para tons de azul, conforme índice de concentração proteica que mantem sensibilidade a parti de $1 \mu\text{g } \mu\text{L}^{-1}$, sendo a intensidade da coloração inversamente proporcional à quantidade proteica ocorrendo este fato em todas as amostras (Cheng, Y., H; et al, 2016).

Tabela 14 - Determinação de proteínas totais via espectrofotometria $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ - de ambos os extratos e soluções diluentes.

TABELA: Determinação de proteínas totais via espectrofotometria $\mu\text{g } \mu\text{L}^{-1}$														
AMOSTRAS	Extratos /Amostras:													
	A1	valor (%)	A2	valor (%)	A3	valor (%)	A4	valor (%)	A5	valor (%)	A6	valor (%)	A7	valor (%)
DILUENTES	Osso liofilizado		Osso estufa		Ac nítrico liofilizado		Ac. acético liofilizado		Rasp hidro de sódio 1mol		hidró de sódio		colágeno padrão	
T Acetato	0,166	81%	0,179	87%	0,093	45%	0,137	67%	0,102	50%	0,084	41%	0,206	100%
T. Acetato+ DMSO1%	0,172	83%	0,191	93%	0,092	45%	0,122	59%	0,083	40%	0,088	43%	0,206	100%
H2O	0,179	87%	0,178	86%	0,097	47%	0,076	37%	0,092	45%	0,073	35%	0,206	100%
0.5M AA	0,153	74%	0,178	86%	0,092	45%	0,14	68%	0,095	46%	0,091	44%	0,206	100%

Fonte: Elaborada pelo autor da pesquisa laboratotio de famacgnosia da UFC.

Com análise da quantificação de proteína observamos que no extrato de colágeno padrão (A7), independente da solução utilizada para dissolução do extrato, não constatamos variação dos valores totais de proteína sendo registrado em 0,206 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$. Já as amostras extraídas por meio da temperatura e pressão sendo A1 e A2, notamos valores da quantificação proteica desta aproximado, tendo uma pequena variação conforme agente utilizado para dissolução. Porém o maior valor registrado na amostra (A1) foi 0,179 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ e menor 0,153 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$. Na amostra (A2) o maior valor foi 0,191 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ e menor 0,178 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$. Constatamos que o processo de dissolução destas amostras podem ter influenciado na quantificação proteica, mas que mesmo com valores estão próximos do valor registrado do colágeno padrão.

Apresentando certa viabilidade quando comparada com o colágeno padrão hidrolisado, por não necessitar de emprego de agentes químicos, utilização de equipamentos, demanda de tempo, e sendo comprovado por este método a existência de proteína nos extratos de forma significativa, onde contêm sua média em torno de 0,175 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$, em porcentagem remete a 85 % do tota proteína contida em 1 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ dos extratos (A1 e A2).

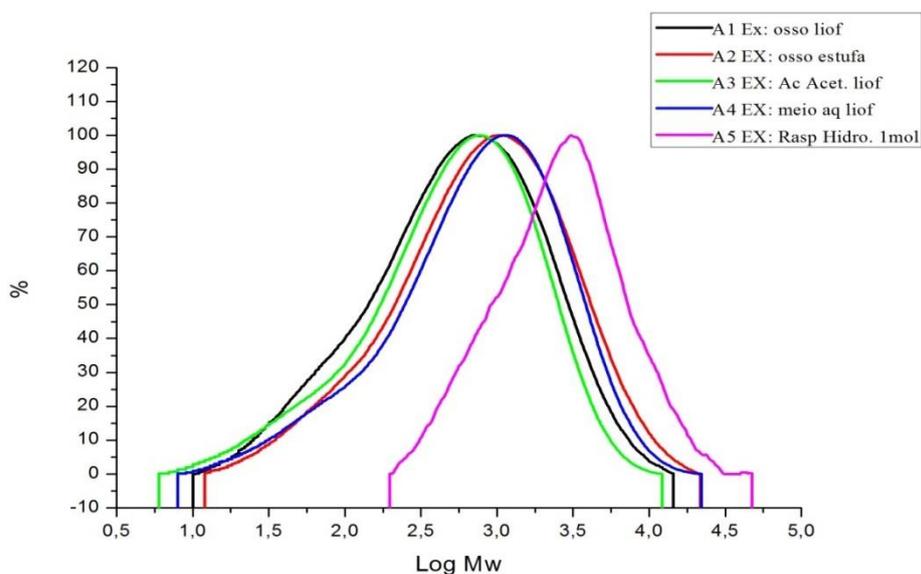
7.6 Cromatografia de Permeação em Gel (GPC)

Com o auxílio do GPC é possível identificar se determinada matéria constitui um polímero devido sua longa cadeia e alta massa molecular superior a 10.000 (MM). Já valores abaixo deste e não menores que 1.000 são denominados de oligômeros, sendo definido de polímeros de baixo peso molecular, e elementos que disponha massa molar acima de 1 milhão considerados polímeros de massa molar ultra-alta (MARTINI, 2010).

Mediante o conhecimento da curva padrão da massa molar e desenho do gráfico cromatográfico obtido das amostras, é possível efetuar o cálculo para descobrir a polidispersividade das diversas massas molares, caracterizando assim o tipo de polímero, tendo em vista que o modelo do equipamento utilizado nesta análise dispõe de um software para exposição do gráfico, massa molar média e valor da polidispersividade.

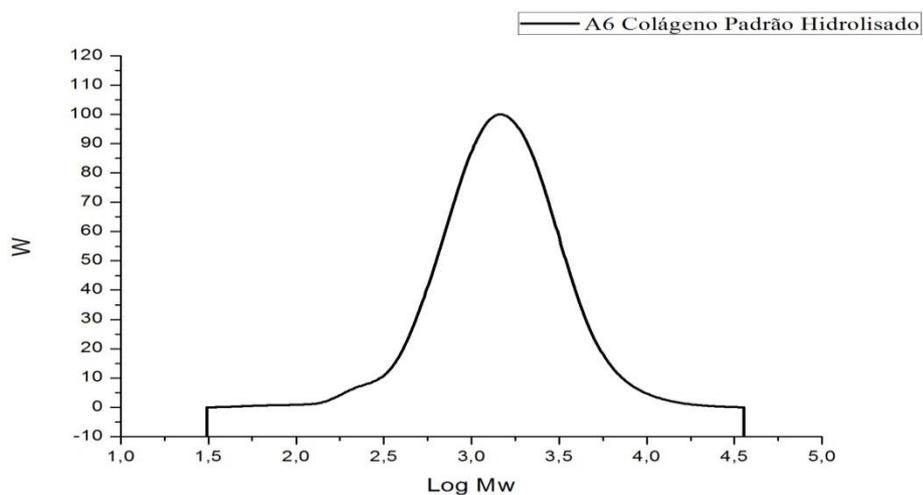
Na figura 38 apontamos as amostras A1 extrato de pés com osso liofilizado, A2 Extrato de pés com osso em estufa, A3 Extrato de Ácido Acético a 1 mol, A4 extrato somente pés em liofilizado, A5 extrato de Raspa de Hidróxido de Sódio a 1 mol, e na Figura 38 determinamos a amostra A6 do colágeno padrão hidrolisado. Posteriormente, foram tratados ambos os gráficos e plotados no origin 8 conforme imagem abaixo.

Figura 38 - Gráfico das amostras/extratos submetidas a cromatografia permeavel em gel - GPC



Fonte: elaborada pelo autor da pesquisa.

Figura 39- Gráfico do colágeno padrão submetidas a cromatografia permeavel em gel – GPC.



Fonte: elaborada pelo autor da pesquisa.

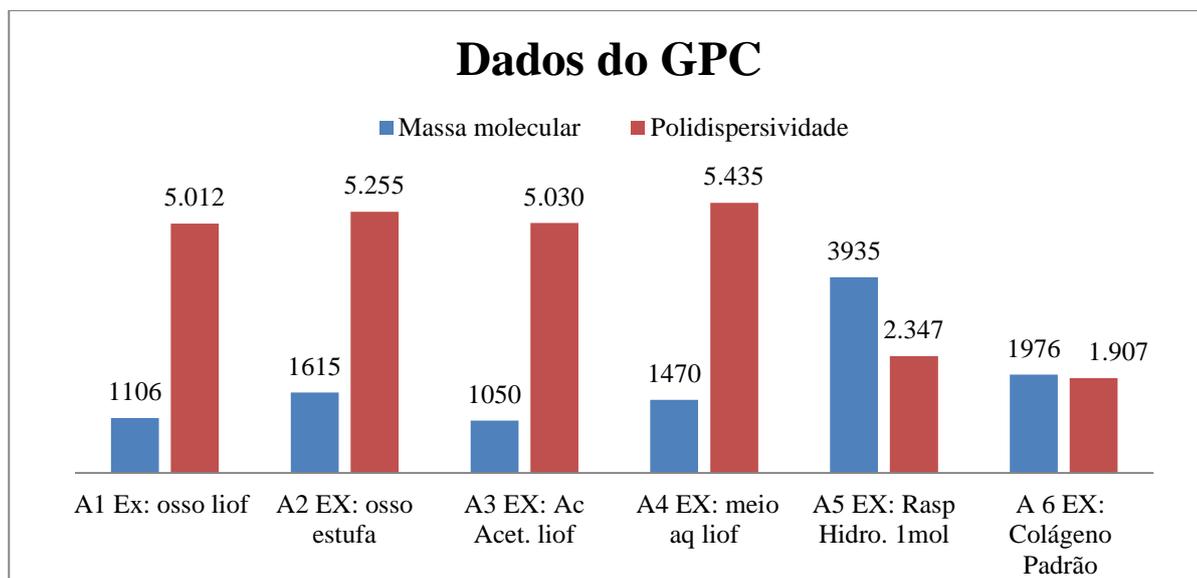
Conforme os gráficos registrados pelo GPC de ambos os extratos, identificamos certa semelhança em todos os perfis das amostras, dispondo de apenas um único pico de distribuição de massa molecular durante toda a corrida, assim como suponhamos que todos os materiais dispõem de uma cadeia grande, ou seja, são macromoléculas poliméricas, tendo em vista que moléculas de tamanho pequeno não obteríamos tais picos.

O valor M_w são os valores da massa molar média que ambos os extratos apresentaram, sendo este o pico mais alto das amostras, sendo encontrado este dado em $\log M_w$ elevado a 10^3 no eixo X, e o eixo Y referindo-se à porcentagem de distribuição da massa, sendo apresentando assim para melhor ilustração dos dados.

É conhecido que o colágeno é um tipo de polímero natural, sendo este utilizado nos diferentes campos de atuação industrial devido ao grande interesse da população em seus componentes. Essas proteínas dispõem-se nos tecidos e organismo humano, assim como, na engenharia de tecidos, liberação de fármacos e produção de biomateriais (KHAN; KHAN, 2013).

O colágeno é uma das principais proteínas estruturantes encontradas na matriz extracelular, sendo este um polímero que apresenta baixa citotoxicidade e antigenicidade próxima de zero, e boa biocompatibilidade no corpo humano, dispondo resistência, força mecânica e rigidez devido ao tamanho de sua estrutura e atuação na formação de tecidos (NAIR et al., 2010). Mediante análise dos extratos, teve-se conhecimento da massa molecular média dos extratos, que se configuram o ponto mais alto registrado na curva do gráfico, e com auxílio do software, foi possível obter-se o valor da polidispersividade das amostras como visualizado na Figura 40.

Figura 40- Massa molecular e polidispersividade das amostras extrainadas e colágeno padrão.



Fonte: Elaborada pelo autor da pesquisa.

O extrato com maior massa molecular média registrado por este método foi extrato A5 raspa de hidróxido de sódio a um mol, tendo valor de sua massa 3935 g/mol de Mw, seguindo pelo A6 referente ao colágeno padrão hidrolisado com valor da massa molecular de 1976 g/mol impresso por Mw. O terceiro com maior valor de massa média foi o extrato A2 pés de frango com osso submetido a estufa, em que encontramos o valor de 1615 g/mol de Mw, já amostra do A4 provindo meio aquoso somente pés liofilizados obtivemos o valor do Mw de 1470 g/mol. O A1 de extrato de pés com osso liofilizado registrou valor, quando comparado ao mesmo extrato submetido ao processo de liofilização, de massa molecular Mw de 1106 g/mol, e o extrato com menor peso molecular foi da Amostra A3 provindo de solução ácido acético a um mol liofilizada com valor de 1050 g/mol para Mw.

Portanto, com a distribuição e registro das massas de uma amostra, deteremos a formação de uma curva de distribuição de massa molar, podendo esta variar seu valor devido à retenção e à oscilação dos eletrodos da coluna cromatográfica, em que certa variação que se encontrasse com uma pequena diferença relativa de aproximadamente 2.0000 Mw é tida como relativa ou similar do padrão.

Sabemos que o aumento da massa molecular de um extrato vai ocasionar uma variação do tamanho da cadeia do polímero, podendo refletir na polidispersividade

e maior distanciamento das pontas do gráfico. Em nossos gráficos, apesar de encontrar-se uma variação do peso molecular, existe uma proximidade dos picos e sua massa, similaridade do registro de distribuição de massa mediante tempo de corrido, e anatomia do gráfico, conforme ilustrado nos gráficos.

No estudo desenvolvido por Rodrigues (2009) sobre colágeno hidrolisado, super hidrolisado e gelatina quando submetidas a teste de GPS, demonstrou-se um perfil molecular abaixo a 10 kDa, contendo a massa molecular média do colágeno super hidrolisado de 1454 g/mol com polidispersividade 1.415. Já em relação ao colágeno hidrolisado, o valor de sua massa média registrada é 1633 g/mol com polidispersividade 1.535 e, quando apresentando em forma de gelatina, massa molecular média 104442 g/mol e polidispersividade 9.522.

Dados do GPC realizados por Rodrigues (2009) apresentam valores similares quando comparados com os resultados obtidos dos extratos desta pesquisa, bem como o perfil dos gráficos encontrar apenas um único pico em todo o processo de corrida.

No que trata o processo de síntese celular e biossíntese de colágeno, são obtidos em melhor proporção quando o valor da massa molecular é menor, tendo em vista esta afirmação devido um estudo realizado por Nishimoto et al. (2002), em que os peptídeos de colágeno de 10000 a 5000 kDa com menor massa molecular induziram com maior relevância o processo de síntese de colágeno na pele de ratos do que as amostras de maior massa molecular, supondo que o tamanho desta massa molecular influenciara na síntese de colágeno e produção de tecidos.

É vista certa indefinição / variação do peso molecular do colágeno, porém, pesquisadores acreditam na existência de um limite máximo de absorção desta proteína, que seria menor que 3.000 unidades de peso molecular para absorção do organismo. Por ser uma macromolécula, precisa ser degradada em moléculas de tamanhos menores, facilitando no processo de absorção e ação ao organismo humano, e tendo melhor aplicação nas áreas médicas, farmacológicas e estética quando observado este ponto (DENIS et al., 2008).

As propriedades do material colagenoso mantêm uma relação direta com a distribuição de massa molecular de suas fibras, podendo esta variar conforme método

de extração, matéria-prima e condições do tipo pH, temperatura e elementos químicos utilizado, influenciando em possíveis alterações estrutural ou molecular e densidade de carga da proteína colagenosa no produto final. Em resumo, o processo de extração de matéria-prima e condições impostas para extração de possível material colagenoso poderá influenciar no tamanho molecular e estrutura final e polidispersão do produto obtido (ACHILLI; MANTOVANI, 2010).

Com base nos resultados obtidos dos extratos desta pesquisa, é visto que apresentaram uma baixa massa molecular média quando visualizados e comparados com outros polímeros de sua natureza, bem como os resultados obtidos por pesquisadores a respeito do peso molecular do colágeno. Visto que quanto menor o tamanho molecular, maior ação deste nos componentes celulares e organismo humano podendo ser mais bem absorvido pelo organismo. Porém, no que refere de polidispersão dos nossos extratos, apresentaram um valor maior do que os registrados em algumas pesquisas, podendo ser reflexo do método de extração, grau de pureza e matéria-prima, dentre outros.

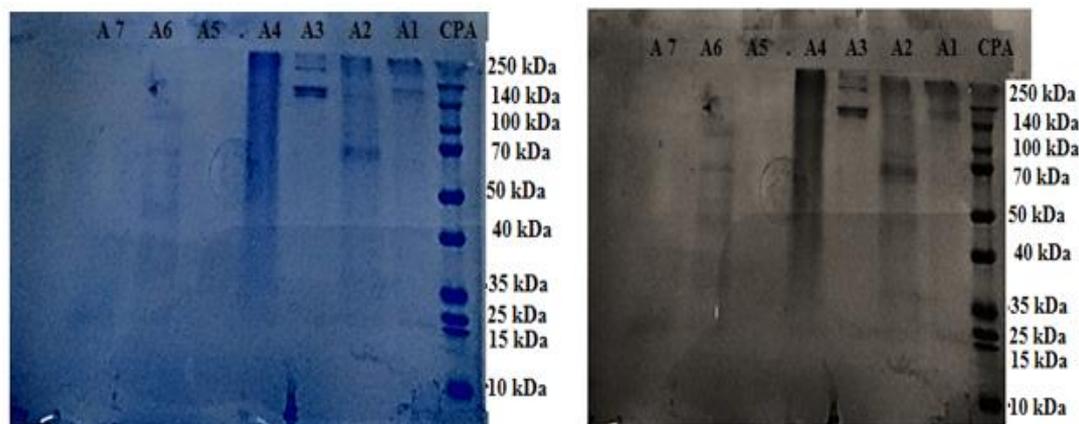
7.7 Eletroforese

A técnica de eletroforese visa descobrir a massa molecular dos extratos e colágeno padrão utilizados nesta pesquisa. Por tal técnica, distingue-se através da separação de fragmentos de espécies eletricamente carregadas, quando expostas a uma corrente elétrica em gel de poliacrilamida na concentração de 7,5% e 4%, onde um encontrava-se exposto sobre o outro.

As amostras submetidas a este teste foram: amostra A1 extrato com osso liofilizado, A2 extrato com osso submetido à estufa, A3 extrato de ácido acético liofilizado, A4 extrato ácido nítrico liofilizado, A5 extrato da raspa do hidróxido de sódio a 1mol, A6 extrato de hidróxido de sódio, e A7 colágeno padrão. CPA é o marcador de peso molecular, o qual foi pesado e diluído 1 mg (um miligrama) para 1 ml (um) em água ultrapura Milli.

Após realização de todas as fases da eletroforese, obtivemos algumas bandas de peso molecular reveladas no gel de poliacrilamida, sendo vistas na Figura 41 conforme demonstrado em duas imagens digitais abaixo.

Figura 41 - Eletroforese e registro de bandas de peso molecular reveladas no gel de poliacrilamida.



Eletroforese e revelaçã de peso molecular em gel de poliacrilamida dos extratos obtidos

Fonte: elaborada pelo autor da pesquisa.

Conforme evidenciado pelo teste de eletroforese, identificamos que as amostras apresentaram certa similaridade de peso molecular, tendo seu registro de massa molecular entre 140 e 100 kDa na coluna de eletroforese das amostras e A1, A2, A3, A4, A6. Ao observar a amostra padrão de colágeno A7 e A5, comprovamos que neste teste de eletroforese em gel, não se registrou em nenhum momento o seu peso molecular conforme as duas eletroforeses realizadas.

Já na amostra A4 existe índice proteico com diferente peso molecular sendo dispersada em boa parte da coluna de eletroforese, porém, não foi possível registrar com melhor definição seu tamanho em kDa, visto que este fato pode manter relação como densidade e poços de corrida do gel.

Sabemos que nas fibras de colágenos, encontramos a presença de duas bandas bem próximas uma da outra em torno de 100 kDa correspondendo aos componentes alfa 1 e alfa 2 no colágeno, sendo seguido por uma banda mas acima que é a cadeia beta da proteína colagenosa (PRESTES, 2011).

Eletroforese desenvolvida com colágeno de origem bovina mostra a presença de duas bandas bem definidas com valor próximo de 123 kDa, sendo alfa 1 e alfa 2 de monômeros de colágeno do tipo 1. Com auxílio da espectrometria, estes valores de alfa 1, alfa 2 e alfa 3 foi fixado tais peso com 133, 129 e 138 kDa em estudo desenvolvido por Alexandretti (2016).

O colágeno extraído do osso de ovinos apresenta uma semelhança das bandas eletroforéticas que indica a presença de um dímero e trímero, correspondendo a componentes de alto peso molecular, das cadeias alfa 1 de 126 kDa, e alfa 2 de 110 kDa, quando comparados com os resultados de pesquisas a respeito da eletroforese do colágeno tipo 1, aponta semelhança dos valores com perfil eletroforético parecido com outras fontes de colágeno já conhecidas (GAO et al., 2018).

Estudos realizados com pele e escama do peixe lagarto, com auxílio da eletroforese, foi possível identificar a existência de duas subunidades para alfa a1 e alfa a2. Além disso, a posição eletroforética desta unidade alfa 1 de 132 kDa e alfa 2 121 kDa sendo definido como colágeno do tipo 1, sendo extraído da pele e escamas dos peixes (CHEN et al., 2016).

Foi visto que os diferentes tipos de amostras trabalhadas nessa pesquisa demonstraram perfil semelhante aos resultados obtidos por outros pesquisadores no que trata de eletroforese, bem como a proximidade das bandas, peso molecular em kDa. Porém, sabemos que a diferenciação da matéria-prima, bem como o processo de extração e falta de determinado componente, podem influenciar no resultado final de uma pesquisa.

É visto que a utilização de pepsina no processo de extração do colágeno é encontrada como certa frequência por auxiliar na clivagem da estrutura colagenosa, tornando mais viável o processo de extração. No entanto, sabe-se que, quando utilizada essa pepsina, tem-se um aumento do rendimento da extração do colágeno quase que o dobro (LIN et al., 2013).

No que refere ao processo de extração de colágeno, é vista a utilização de componentes químicos e meios físicos para obtenção de tais resultados. No desenvolvimento dessa pesquisa foi possível realizar extração do colágeno apenas com meio físico, detendo bom rendimento do material extraído que configurasse mediante resultados e estudo já realizado em colágeno do tipo 1. Foi possível, também, desenvolver extração do mesmo com utilização de componentes químicos mesmo na falta e limitação de alguns produtos importantes, como, por exemplo, a pepsina.

7.8 Ensaio de toxicidade do extrato com a *Artemia salina*.

O experimento de ecotoxicidade com *Artemia salina* foi desenvolvido com intuito de avaliar a existência de toxicidade preliminar dos extratos/amostras de material à base de colágeno em um sistema biológico do reino animal, em diferentes diluições/concentrações.

As amostras submetidas para este teste foram: A1 extrato mediante aquecimento e pressão com osso liofilizado, A2 extrato mediante aquecimento e pressão com osso em estufa, A3 extrato ácido acético liofilizado á 1 mol, A4 extrato mediante aquecimento e pressão liofilizado, A5 extrato mediante raspa de hidróxido de sódio a 1 mol, A6 extrato ácido nítrico, e A7 colágeno padrão. A análise foi realizada em triplicata.

A diluição das amostras foi junto à solução salina, estando em contato com as larvas. Observamos que ambos os extratos testados não expressaram mortalidade das *Artemia salina*, estando estas, após as 48 horas de eclosão em seu estagio de D3, bem ativas, movimento-se e deslocando-se na direção da luz, sendo notado o seu crescimento/desenvolvimento de forma progressiva desde seu estagio de náuplios.

O resultado obtidos das concentrações testadas 1; 500; 250; 125; 0,062; 0,031 mg/mL dos testes em triplica em ambas as amostras indicaram previamente que os extratos testados não dispõe de uma provável bioatividade citotóxica, conforme ensaio pré-clínico agudo de dose fixa, pelos critérios e metodologia estabelecida por Meyer et al. (1982).

A verificação da toxicidade por meio *Artemia salina* se configura em ser um experimento rápido, eficiente, de baixo custo, que carece de pequena quantidade de amostras, cerca de (1- 20 mg), não precisando de técnicas assépticas, bem como equipamento sofisticados de média e alta complexidade para sua realização, dispondo praticidade para ser realizado em qualquer laboratório quando abordado técnica correta (MILANI; ZIOLLI, 2007).

Segundo McLaughlin (1998) dissertar que esse método de análise para atividade citotóxica é bastante viável, sendo indicado a sua realização como uma primeira análise do potencial de citotoxicidade para novos compostos, a exemplo da

descoberta de novas classes de agentes antitumorais “Annonaceous acetogenins” que fez uso deste.

Assim, estes ensaios/testes em *in vitro* são essenciais no processo de compreensão e entendimento dos compostos e suas ações quando em contato no organismo vivo, sendo relevante para aprofundamento de novos estudos no campo da toxicologia (GIULIANO et al., 2009).

Sabe-se que o colágeno e biomateriais que constituem essa proteína, nas formas de hidrogel, pó, esponja, curativos, eventos hemostáticos, dentre outros, na maioria das vezes, não se apodera de características citotóxicas e antigenicidade, sendo estes biocompatível, biodegradável e essenciais ao organismo humano (SADER et al., 2013).

O colágeno é um dos constituintes bases para formação, desenvolvimento e crescimento celular, estando presente em grande proporção no organismo humano. Sendo um dos componentes da matriz extracelular, não é pra apresentar resposta citotóxica (BOCCAFOSCHI et al., 2005; CHAJRA et al., 2008). Assim, o mesmo é utilizado para diversas finalidades e aplicações no campo científico, biomédico, farmacológico, cosméticos e gênero alimentício em virtude de alta resistência, biocompatibilidade, baixa antigenicidade, não citotoxicidade e características não inflamatórias (NETO, 2011).

Um estudo desenvolvido com colágeno hidrolisado, super hidrolisado e gelatina de origem bovina, para verificar o processo de citotoxicidade em células *in vitro*, concluiu que ambas as células tratadas em todas as concentrações testadas neste não abancaram ação tóxica, sendo estas consideradas intóxicas para os organismos testados (RODRIGUES, 2009).

Os resultados obtidos das amostras submetidas a teste de citotoxicidade apresentam certa familiaridade aos resultados expostos e descritos por pesquisadores, no que se refere a não existência de ação citotóxica do colágeno no organismo, bem como por conhecer as propriedades que dispõe ao organismo. Com a realização desse teste, vimos certa semelhança com resultados de pesquisa que descrevem processo de citotoxicidade do colágeno, assim como ao colágeno padrão testado.

8.0 Conclusão

Mediante realização deste trabalho foi possível obter extrato de amostras provindas de pés de *gallus gallus domesticus* que apresenta certa familiaridade e características semelhantes quando comparados com colágeno hidrolisado comercializado, tendo em vista os resultados obtidos nos testes descritos e desenvolvidos desta pesquisa.

Com base no método proposto por Liu (2010) com algumas adaptações, foi possível realizar extração de material colagenoso, assim como, obtivemos boa quantidade de amostra extraída. No que trata o segundo método de extração utilizado nesta pesquisa, o mesmo resultou em maior quantidade de extrato quando comparado com o primeiro método. Porém ambos os métodos se fez á utilização de agentes químicos em diferentes concentrações e equipamentos específicos, tendo em vista que não se conhece um protocolo ou método específico com finalidade de extração de material colagenoso provido de pés *gallus gallus domesticus*.

Já o terceiro método de extração aplicado nesta pesquisa foi o método que apresentou melhor viabilidade de extração do material colagenoso, tendo em vista que não utilizamos emprego de agente químico, muito menos a necessidade de equipamentos específicos, como visualizado do primeiro e segundo método de extração desta pesquisa. Sendo rápido e acessível o processo de extração para obtenção de extrato/amostras em quantidade de significativa e superior ao valor obtido pelo método de Liu (2010).

No que trata do processo de caracterização de ambas as amostras providas dos métodos utilizados, foi possível realizar sua caracterização por meio da espectroscopia de infravermelho, no qual identificamos os grupos funcionais que constitui a proteína de colágeno, estando presente tais grupos em todas as amostras. No entanto as amostras do terceiro método de extração tiveram desenho do gráfico similar ao colágeno padrão, apresentando uma maior quantidade dos grupos funcionais que são reconhecidos para o colágeno quando comparado com dados impressos pelo colágeno padrão.

Por meio da espectroscopia de proteína uv vis e infravermelho foi possível identificar e caracterizar as amostras mediante resultados encontrados nas análise e conteúdo descrito em pesquisas, leva acreditar que obtivemos extração de

material colágeno do tipo I por três métodos distintos. Tendo em vista que os gráficos das amostras foram similares para todos os testes aplicados com viés de caracterizar e identificar a proteína de colágeno, assim como, a quantidade de proteína nas amostras estavam presente em algumas amostras em boa concentração em outras não.

Em relação a quantidade de proteína encontrada nas amostras obtidas pelo terceiro método de extração, apresentaram valor proteico aproximado ao valor total do colágeno padrão. Pois certa variação pode manter relação com o processo de dissolução do extrato com os reagentes utilizados, tendo em vista que o valor de polidispersividade destas amostras foi superior ao padrão, mais que o tamanho da sua massa molecular foi inferior. Conforme estudos realizados com colágeno e aplicação no organismo, os mesmos constam que quanto menor o valor da massa molecular do colágeno, melhor absorção e aplicabilidade do mesmo no organismo.

Ressaltamos que os resultados a base dos extratos provindos de pés de *gallus gallus domesticus* em específico do terceiro método de extração podem dispor sistemas farmacêuticos em forma de gel, gelatina, placa, em pó, diluição líquida e coberturas protetoras, necessitando de certo delineamento e desenvolvimento de novas pesquisas que vise aprimorar e aprofundar tais sistemas focando sua aplicabilidade e teste mais complexos, em específico no tratamento, prevenção, proteção e recuperação de lesões que atinge o tecido cutâneo e tecidos.

Conclui-se que o terceiro método de extração foi mais viável para obtenção de material colagenoso do tipo I provindo dos pés de *gallus gallus domesticus* quando comparado com o método de extração proposto por Liu (2010). Assim como obtivemos valores proteicos satisfatório nas amostras, massa molecular menor que o colágeno padrão, resultados positivamente em possíveis aplicações ao organismo. No que trata a toxicidade não foi apresentada junto ao organismo testado de *Artemia salina*, sendo atingidos todos os objetivos propostos por esta pesquisa.

9.0 Referências.

ABOU NEEL, E. A. et al. Collagen--emerging collagen based therapies hit the patient. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 65, n. 4, p. 429–456, abr. 2013.

ACHILLI, M.; MANTOVANI, D. Tailoring Mechanical Properties of Collagen-Based Scaffolds for Vascular Tissue Engineering: The Effects of pH, Temperature and Ionic Strength on Gelation. **Polymers**, v. 2, n. 4, p. 664–680, 6 dez. 2010.

- ADIGUZEL, E. et al. Type VIII collagen signals via β 1 integrin and RhoA to regulate MMP-2 expression and smooth muscle cell migration. **Matrix Biology: Journal of the International Society for Matrix Biology**, v. 32, n. 6, p. 332–341, 8 ago. 2013.
- ALBERTS, B. et al. **Molecular Biology of the Cell**. 3rd. ed. [s.l.] Garland Science, 1994.
- ALEXANDRE, S.; MATIAS, A. **Monografia do Projeto a Execução**. 2. ed. Rio de Janeiro: Estácio de Sá, 2006.
- ALEXANDRETTI, C. UNIVERSIDADE REGIONAL INTEGRADA DO ALTO URUGUAI E MISSÕES URI ERECHIM DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA DE ALIMENTOS. p. 83, 2016.
- AMARANTE, C. B. DO et al. Phytochemical study bioassay-guided by tests of toxicity on *Artemia salina* and antiplasmodial activity from stem of aninga (*Montrichardia linifera*). **Acta Amazonica**, v. 41, n. 3, p. 431–434, 2011.
- BENEDETTO, C. D. et al. Production, characterization and biocompatibility of marine collagen matrices from an alternative and sustainable source: the sea urchin *Paracentrotus lividus*. **Marine Drugs**, v. 12, n. 9, p. 4912–4933, 24 set. 2014.
- BHAGWAT, P. K.; DANDGE, P. B. Collagen and collagenolytic proteases: A review. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 15, p. 43–55, 1 jul. 2018.
- BOCCAFOSCHI, F. et al. Biological performances of collagen-based scaffolds for vascular tissue engineering. **Biomaterials**, v. 26, n. 35, p. 7410–7417, dez. 2005.
- BONFRATE, V. et al. Enhanced electrical conductivity of collagen films through long-range aligned iron oxide nanoparticles. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 501, p. 185–191, 1 set. 2017.
- BRADLEY. Collagen type V expression and localization in aging skin. **Journal of the American Academy of Dermatology**, v. 76, n. 6, p. AB75, 1 jun. 2017.
- BRINCKMANN, J.; NOTBOHM, H.; MÜLLER, P. K. (EDS.). **Collagen: Primer in Structure, Processing and Assembly**. Berlin Heidelberg: Springer-Verlag, 2005.
- BRODSKY, B.; RAMSHAW, J. A. The collagen triple-helix structure. **Matrix Biology: Journal of the International Society for Matrix Biology**, v. 15, n. 8–9, p. 545–554, mar. 1997.
- CAI, L.; HEILSHORN, S. C. Designing ECM-mimetic materials using protein engineering. **Acta Biomaterialia**, v. 10, n. 4, p. 1751–1760, abr. 2014.
- CALVI, E. N. DE C. et al. An experimental model for the study of collagen fibers in skeletal muscle. **Acta Cirurgica Brasileira**, v. 27, n. 10, p. 681–686, out. 2012.

- CAMPOS, A. C. L.; BORGES-BRANCO, A.; GROTH, A. K. Cicatrização de feridas. **ABCD. Arquivos Brasileiros de Cirurgia Digestiva (São Paulo)**, v. 20, n. 1, p. 51–58, mar. 2007.
- CANTY, E. G.; KADLER, K. E. Procollagen trafficking, processing and fibrillogenesis. **Journal of Cell Science**, v. 118, n. Pt 7, p. 1341–1353, 1 abr. 2005.
- CASTRO, P. A. A. DE. **Espectroscopia de absorção no infravermelho em pele queimada: avaliação de potenciais biomarcadores para o reparo tecidual**. text— [s.l.] Universidade de São Paulo, 7 fev. 2018.
- CENCI, D. F. **ESTUDO DA INFLUÊNCIA DE VARIÁVEIS DO PROCESSO EMULSIFICAÇÃO DE MORTADELA DE FRANGO**. Erechim - RS, 2013.
- CHAJRA, H. et al. Collagen-based biomaterials and cartilage engineering. Application to osteochondral defects. **Bio-Medical Materials and Engineering**, v. 18, n. 1 Suppl, p. S33-45, 2008.
- CHEN, J. et al. Extraction and characterization of acid-soluble collagen from scales and skin of tilapia (*Oreochromis niloticus*). **LWT - Food Science and Technology**, v. 66, p. 453–459, 1 mar. 2016.
- CHIEN, J. C. W. Solid-State Characterization of the Structure and Property of Collagen. **Journal of Macromolecular Science, Part C**, v. 12, n. 1, p. 1–80, 1 jan. 1975.
- CHIQUET, M. et al. Collagen XII: Protecting bone and muscle integrity by organizing collagen fibrils. **The International Journal of Biochemistry & Cell Biology**, v. 53, p. 51–54, ago. 2014.
- CHURMS, S. C. Recent progress in carbohydrate separation by high-performance liquid chromatography based on size exclusion. **Journal of Chromatography A**, v. 720, n. 1, p. 151–166, 12 jan. 1996.
- COHEN, A. H. Collagen Type III Glomerulopathies. **Advances in Chronic Kidney Disease**, v. 19, n. 2, p. 101–106, mar. 2012.
- COLE, C. G. B.; ROBERTS, J. J. Gelatine colour measurement. **Meat Science**, v. 45, n. 1, p. 23–31, 1 jan. 1997.
- CROSSON, P. et al. review of whole farm systems models of greenhouse gas emissions from beef and dairy cattle production systems. **Animal feed science and technology**, 2011.
- DE ALMEIDA, P. F.; FARIAS, B.; SANTANA, J. C. C. FTIR Characterization of Gelatin from Chicken Feet. p. 5, 2012.
- DE S LUNA, J. et al. A study of the larvicidal and molluscicidal activities of some medicinal plants from northeast Brazil. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 97, n. 2, p. 199–206, 28 fev. 2005.

- DENIS, A. et al. Molecular weight determination of hydrolyzed collagens. **Food Hydrocolloids**, v. 22, n. 6, p. 989–994, ago. 2008.
- DUAN, R. et al. Properties of collagen from skin, scale and bone of carp (*Cyprinus carpio*). **Food Chemistry**, v. 112, n. 3, p. 702–706, 1 fev. 2009.
- DUARTE, F. O. S. **PROPRIEDADES FUNCIONAIS DO COLÁGENO E SUA FUNÇÃO NO TECIDO MUSCULAR**. Goiânia, 2011. Disponível em: <<http://www.ebah.com.br/content/ABAAAE6xwAG/propriedades-colageno>>. Acesso em: 1 nov. 2016.
- EHRMANN, R. L.; GEY, G. O. The growth of cells on a transparent gel of reconstituted rat-tail collagen. **Journal of the National Cancer Institute**, v. 16, n. 6, p. 1375–1403, jun. 1956.
- ELANGO, J.; BU, Y.; BIN, B. **Effect of chemical and biological cross-linkers on mechanical and functional properties of shark catfish skin collagen films - Dimensions**. Disponível em: <<https://app.dimensions.ai/details/publication/pub.1018932224>>. Acesso em: 17 nov. 2018.
- FATHIMA, N. N. et al. Interaction of aldehydes with collagen: effect on thermal, enzymatic and conformational stability. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 34, n. 4, p. 241–247, ago. 2004.
- FENNEMA, O. R.; DAMODARAN, S.; PARKIN, K. **Química de Alimentos de Fennema - 4ª Ed. 2010**. 4. ed. [s.l.] Artmed, 2010.
- FERREIRA, A. et al. Brazilian poultry activity waste: Destinations and energetic potential. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 81, n. P2, p. 3081–3089, 2018.
- FERREIRA, A. M. et al. Collagen for bone tissue regeneration. **Acta Biomaterialia**, v. 8, n. 9, p. 3191–3200, set. 2012.
- FERREIRA, M. F. **EXTRAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE GELATINA PROVENIENTE DE SUBPRODUTOS DO FRANGO: PÉS**. p. 48, 2013.
- FIGUEIREDO, G. I. **UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ CENTRO DE CIÊNCIAS DEPARTAMENTO DE QUÍMICA ORGÂNICA E INORGÂNICA PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA**. Fortaleza - CE, 2015.
- FRANCO, D.; GONÇALVES, L. F. Feridas cutâneas: a escolha do curativo adequado. **Revista do Colégio Brasileiro de Cirurgiões**, v. 35, n. 3, p. 203–206, jun. 2008.
- FRIEL, S. et al. Public health benefits of strategies to reduce greenhouse-gas emissions: food and agriculture. **The Lancet**, v. 374, n. 9706, p. 2016–2025, dez. 2009.

- GALIA, C. R. et al. Caracterização físico-química do enxerto de osso bovino liofilizado. **Revista Brasileira de Ortopedia**, v. 46, n. 4, p. 444–451, 2011.
- GAO, L. et al. The characterization of acid and pepsin soluble collagen from ovine bones (Ujumuqin sheep). **Journal of Integrative Agriculture**, v. 17, n. 3, p. 704–711, 1 mar. 2018.
- GASPAR, P. J. S. et al. Impacto da formação profissional contínua nos custos do tratamento das feridas crônicas. **Revista de Enfermagem Referência**, v. serIII, n. 1, p. 53–62, jul. 2010.
- GAUZA-WŁODARCZYK, M.; KUBISZ, L.; WŁODARCZYK, D. Amino acid composition in determination of collagen origin and assessment of physical factors effects. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 104, n. Pt A, p. 987–991, nov. 2017.
- GIULIANO, M. et al. Effects of low concentrations of benzene on human lung cells in vitro. **Toxicology Letters**, v. 188, n. 2, p. 130–136, 24 jul. 2009.
- GOISSIS, A. P. A. **Análise estrutural do colágeno tipo I. Correlação estrutura: atividade biológica**. São Carlos - SP, 2007.
- GOKCE, S.; TUREYEN, A.; GOKCIMEN, A. **Effects of hypericum perforatum, clinoptilolite and hydrocolloid dressing on wound healing in diabetic rats**. 2018.
- GOMES, L. M. **Enfermagem e Úlceras por Pressão: Da Reflexão sobre a Disciplina às Evidências nos Cuidados**. Grupo ICE – Investigação Científica em Enfermagem., , 2011. Disponível em:
<http://sociedadeferidas.pt/documentos/Enfermagem_e_ulceras_por_Pressao_-_Colectanea.pdf>. Acesso em: 30 out. 2013
- GÓMEZ-GUILLÉN, M. C. et al. Functional and bioactive properties of collagen and gelatin from alternative sources: A review. **Food Hydrocolloids**, 25 years of Advances in Food Hydrocolloid Research. v. 25, n. 8, p. 1813–1827, 1 dez. 2011.
- GONÇALVES, G. R.; OLIVEIRA, M. A. S.; MOREIRA, R. F. **BENEFÍCIOS DA INGESTÃO DE COLÁGENO PARA O ORGANISMO HUMANO**. p. 18, [s.d.].
- GRÄSSEL, S.; BAUER, R. J. Collagen XVI in health and disease. **Matrix Biology: Journal of the International Society for Matrix Biology**, v. 32, n. 2, p. 64–73, 11 mar. 2013.
- GRINNELL, F.; PETROLL, W. M. Cell motility and mechanics in three-dimensional collagen matrices. **Annual Review of Cell and Developmental Biology**, v. 26, p. 335–361, 2010.
- HAN, Q. et al. The promotion of neural regeneration in an extreme rat spinal cord injury model using a collagen scaffold containing a collagen binding neuroprotective protein

and an EGFR neutralizing antibody. **Biomaterials**, v. 31, n. 35, p. 9212–9220, dez. 2010.

HASAN, A. et al. Injectable Hydrogels for Cardiac Tissue Repair after Myocardial Infarction. **Advanced Science (Weinheim, Baden-Wurttemberg, Germany)**, v. 2, n. 11, p. 1500122, nov. 2015.

HASHIM, P.; RIDZWAN, M. S. M.; BAKAR, J. Isolation and Characterization of Collagen from Chicken Feet. v. 8, n. 3, p. 5, 2014.

HEIKKINEN, A.; TU, H.; PIHLAJANIEMI, T. Collagen XIII: a type II transmembrane protein with relevance to musculoskeletal tissues, microvessels and inflammation. **The International Journal of Biochemistry & Cell Biology**, v. 44, n. 5, p. 714–717, maio 2012.

HENDOW, E. K. et al. Biomaterials for hollow organ tissue engineering. **Fibrogenesis & Tissue Repair**, v. 9, 23 mar. 2016.

HODDE, J. P. et al. Retention of endothelial cell adherence to porcine-derived extracellular matrix after disinfection and sterilization. **Tissue Engineering**, v. 8, n. 2, p. 225–234, abr. 2002.

HOLMES, C. et al. Collagen-based wound dressings for the treatment of diabetes-related foot ulcers: a systematic review. **Diabetes, Metabolic Syndrome and Obesity: Targets and Therapy**, v. 6, p. 17–29, 2013.

HOOGENKAMP, H. R. et al. Directing collagen fibers using counter-rotating cone extrusion. **Acta Biomaterialia**, v. 12, p. 113–121, jan. 2015.

HSU, H.-H. et al. Type V collagen fibrils in mouse metanephroi. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 441, n. 3, p. 649–654, 22 nov. 2013.

HUANG, X. et al. Single-molecule level binding force between collagen and collagen binding domain-growth factor conjugates. **Biomaterials**, v. 34, n. 26, p. 6139–6146, ago. 2013.

HUANG, Y.-R. et al. Isolation and characterization of acid and pepsin-solubilized collagens from the skin of balloon fish (*Diodon holocanthus*). **Food Hydrocolloids**, v. 25, n. 6, p. 1507–1513, 1 ago. 2011.

ISAAC, C. et al. Role of keratinocytes in wound contraction: an impact assessment using a model of collagen matrix populated with fibroblasts. **Revista Brasileira de Cirurgia Plástica**, v. 26, n. 3, p. 402–406, set. 2011.

JEEVITHAN, E. et al. Isolation, purification and characterization of pepsin soluble collagen isolated from silvertip shark (*Carcharhinus albimarginatus*) skeletal and head bone. **Process Biochemistry**, v. 49, n. 10, p. 1767–1777, out. 2014.

JÚNIOR, E. DE S. C. **Desenvolvimento de matriz de Quitosana/PVA, quimicamente reticulado para aplicação potencial em engenharia de tecido epitelial.**

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS, 2008.

JÚNIOR, M. A. P. O.; ORRICO, A. C. A.; JÚNIOR, J. D. L. Engenharia Agrícola. **COMPOSTAGEM DOS RESÍDUOS DA PRODUÇÃO AVÍCOLA: CAMA DE FRANGOS E CARCAÇAS DE AVES**, p. p.538-545, jun. 2010.

JUNQUEIRA, LUIZ CARLOS UCHOA. **Junqueira - Histologia básica — bibicbs.** Disponível em: <<http://www.ufrgs.br/bibicbs/livros-novos/junqueira-histologia-basica-1>>. Acesso em: 15 nov. 2018.

KALHOR, T. et al. Environmental impact assessment of chicken meat production using life cycle assessment. **Information Processing in Agriculture**, v. 3, n. 4, p. 262–271, dez. 2016.

KARSDAL, M. **Biochemistry of Collagens, Laminins and Elastin: Structure, Function and Biomarkers.** 1 edition ed. London, United Kingdom ; San Diego, CA, United States: Academic Press, 2016.

KEW, S. J. et al. Regeneration and repair of tendon and ligament tissue using collagen fibre biomaterials. **Acta Biomaterialia**, v. 7, n. 9, p. 3237–3247, set. 2011.

KHAN, R.; KHAN, M. H. Use of collagen as a biomaterial: An update. **Journal of Indian Society of Periodontology**, v. 17, n. 4, p. 539–542, 2013.

KIM, R. Y. et al. The effect of dose on rhBMP-2 signaling, delivered via collagen sponge, on osteoclast activation and in vivo bone resorption. **Biomaterials**, v. 35, n. 6, p. 1869–1881, fev. 2014.

KITTIPHATTANABAWON, P. et al. Characterisation of acid-soluble collagen from skin and bone of bigeye snapper (*Priacanthus tayenus*). **Food Chemistry**, v. 89, n. 3, p. 363–372, 1 fev. 2005.

KONG, J.; YU, S. Fourier transform infrared spectroscopic analysis of protein secondary structures. **Acta Biochimica Et Biophysica Sinica**, v. 39, n. 8, p. 549–559, ago. 2007.

KRUG, D. et al. Minor cartilage collagens type IX and XI are expressed during embryonic stem cell-derived in vitro chondrogenesis. **Annals of Anatomy = Anatomischer Anzeiger: Official Organ of the Anatomische Gesellschaft**, v. 195, n. 1, p. 88–97, jan. 2013.

KUZAN, A. et al. The content of collagen type II in human arteries is correlated with the stage of atherosclerosis and calcification foci. **Cardiovascular Pathology: The Official Journal of the Society for Cardiovascular Pathology**, v. 28, p. 21–27, jun. 2017.

LANCELOTTI, C. **Preparação e caracterização de hidrogéis neutros de colágeno aniônico:gelatina:extrato de semente de uva.** text—[s.l.] Universidade de São Paulo, 9 jun. 2014.

LAWALL, H. Treatment of chronic wounds. **VASA. Zeitschrift fur Gefasskrankheiten**, v. 41, n. 6, p. 396–409, nov. 2012.

LEÓN-MANCILLA, B. H. et al. Physico-chemical characterization of collagen scaffolds for tissue engineering. **Journal of Applied Research and Technology**, v. 14, n. 1, p. 77–85, 1 fev. 2016.

LI, H. et al. Studies on bullfrog skin collagen. **Food Chemistry**, v. 84, n. 1, p. 65–69, jan. 2004.

LIN, C.-W. et al. Evaluation of convenient extraction of chicken skin collagen using organic acid and pepsin combination. p. 12, 2013.

LIU, D. et al. Extraction and characterisation of pepsin-solubilised collagen from fins, scales, skins, bones and swim bladders of bighead carp (*Hypophthalmichthys nobilis*). **Food Chemistry**, v. 133, n. 4, p. 1441–1448, ago. 2012.

LIU, D. et al. Extraction and characterization of acid- and pepsin-soluble collagens from the scales, skins and swim-bladders of grass carp (*Ctenopharyngodon idella*). **Food Bioscience**, v. Complete, n. 9, p. 68–74, 2015.

LIU, X. et al. Hydrogen peroxide-induced degradation of type I collagen fibers of tilapia skin. **Food Structure**, v. 1–2, n. 2, p. 41–48, 2014.

MACLEOD, M.; GERBER, P.; MOTTET, A. **Greenhouse Gas Emissions From Pig And Chicken Supply Chains.** Rome: AGA/FAO, 2012.

MARTÍNEZ-ORTIZ, M. A. et al. Extraction and characterization of collagen from rabbit skin: partial characterization. **CyTA - Journal of Food**, v. 13, n. 2, p. 253–258, 3 abr. 2015.

MARTINI, D. DOS S. Polímeros derivados do biodiesel do óleo de linhaça : obtenção e propriedades físico-químicas. 2010.

MCALINDEN, A. et al. Molecular properties and fibril ultrastructure of types II and XI collagens in cartilage of mice expressing exclusively the $\alpha 1$ (IIA) collagen isoform. **Matrix biology : journal of the International Society for Matrix Biology**, v. 34, p. 105–113, fev. 2014.

MCDERMOTT-SCALES, L.; COWMAN, S.; GETHIN, G. Prevalence of wounds in a community care setting in Ireland. **Journal of Wound Care**, v. 18, n. 10, p. 405–417, out. 2009.

- MCLAUGHLIN, J. L.; ROGERS, L. L.; ANDERSON, J. E. The Use of Biological Assays to Evaluate Botanicals. **Drug Information Journal**, v. 32, n. 2, p. 513–524, 1 abr. 1998.
- MCLEOD, O. et al. Autoantibodies against basement membrane collagen type IV are associated with myocardial infarction. **International Journal of Cardiology. Heart & Vasculature**, v. 6, p. 42–47, 30 dez. 2014.
- MEYER, B. et al. **Brine shrimp: a convenient general bioassay for active plant constituents.** - PubMed - NCBI. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17396775>>. Acesso em: 16 nov. 2018.
- MILANI, M. G.; ZIOLLI, R. L. Avaliação do potencial tóxico de novos compostos e de compostos de interesse ambiental através do ensaio de toxicidade aguda utilizando *Artemia salina*. p. 9, 2007.
- MIRITZ, L. D.; TIMM, L. C.; FILHO, J. P. M. GESTÃO DE RESÍDUOS SÓLIDOS NA PRODUÇÃO DE CARNE DE FRANGO SOLID WASTE MANAGEMENT IN CHICKEN MEAT PRODUCTION. p. 4, 2015.
- MONTEIRO, E. M.; SHIMOKOMAKI, M. Inter-relação da estrutura muscular e textura da carne. p. 29, [s.d.].
- MORAIS, G. F. DA C.; OLIVEIRA, S. H. DOS S.; SOARES, M. J. G. O. Avaliação de feridas pelos enfermeiros de instituições hospitalares da rede pública. **Texto & Contexto - Enfermagem**, v. 17, n. 1, p. 98–105, mar. 2008.
- MUYONGA, J. H. **Extraction and physico-chemical characterisation of Nile perch (*Lates niloticus*) skin and bone gelatin** - ScienceDirect. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0268005X03001528>>. Acesso em: 16 nov. 2018.
- NAKAMURA, S. et al. Effect of controlled release of fibroblast growth factor-2 from chitosan/fucoidan micro complex-hydrogel on in vitro and in vivo vascularization. **Journal of Biomedical Materials Research. Part A**, v. 85, n. 3, p. 619–627, 1 jun. 2008.
- NASCIMENTO, G. R. DO et al. Índice fuzzy de conforto térmico para frangos de corte. **Engenharia Agrícola**, v. 31, n. 2, p. 219–229, abr. 2011.
- NEKLYUDOV, A. D. Nutritive Fibers of Animal Origin: Collagen and Its Fractions as Essential Components of New and Useful Food Products. **Nutritive Fibers of Animal Origin: Collagen and Its Fractions as Essential Components of New and Useful Food Products**, p. 229–238, maio 2003.
- NELSON, D. L.; COX, M. M. **Princípios de bioquímica de Lehninger** — bibicbs. 6. ed. Porto Alegre: Artmed, 2014.

NETO, J. M. D. R. **Caracterização de membranas de colágeno modificado com extrato de frutos de *Genipa americana* L.** Aracaju, 2011.

NISHIE, W. et al. Context-Dependent Regulation of Collagen XVII Ectodomain Shedding in Skin. **The American Journal of Pathology**, v. 185, n. 5, p. 1361–1371, 1 maio 2015.

NISHIMOTO, S. (MARUHA C. et al. Effect of oral administration of gelatin and collagen peptides on the hydroxyproline content of rats skin. **Journal of the Japanese Society for Food Science and Technology (Japan)**, 2002.

AOAC. **Official Methods of Analysis of AOAC INTERNATIONAL**. 15. ed. [s.l: s.n.].

OECHSLE, A. M. et al. Collagen entanglement influenced by the addition of acids. 2014.

OEFNER, C. M. et al. Collagen type IV at the fetal–maternal interface. **Placenta**, v. 36, n. 1, p. 59–68, jan. 2015.

OFFEDDU, G. S. et al. Structural determinants of hydration, mechanics and fluid flow in freeze-dried collagen scaffolds. **Acta Biomaterialia**, v. 41, p. 193–203, 01 2016.

OLIVEIRA, S. H. DOS S.; SOARES, M. J. G. O.; ROCHA, P. DE S. Uso de cobertura com colágeno e aloe vera no tratamento de ferida isquêmica: estudo de caso. **Revista da Escola de Enfermagem da USP**, v. 44, n. 2, p. 346–351, jun. 2010.

LOUDART, J.-B. et al. Type XIX collagen: A new partner in the interactions between tumor cells and their microenvironment. **Matrix Biology: Journal of the International Society for Matrix Biology**, v. 57–58, p. 169–177, 2017.

OVIEDO-RONDÓN, E. O. Technologies to mitigate the environmental impact of broiler production. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 37, n. spe, p. 239–252, jul. 2008.

PAGNON-MINOT, A. et al. Collagen XV, a novel factor in zebrafish notochord differentiation and muscle development. **Developmental Biology**, v. 316, n. 1, p. 21–35, 1 abr. 2008.

PATI, F. et al. Collagen scaffolds derived from fresh water fish origin and their biocompatibility. **Journal of Biomedical Materials Research. Part A**, v. 100, n. 4, p. 1068–1079, abr. 2012.

PAVIA, D. L.; LAMPMAN, G. M.; KRIZ, G. S. **Introdução à Espectroscopia**. 4. ed. São Paulo: Cengage, 2010.

PEDROSO, M. G. **Estudo comparativo de colágeno hidrolisado e comercial com adição de PVA**. São Carlos, 2009.

PRABAVATHI, N.; NILUFER, A.; KRISHNAKUMAR, V. Spectroscopic (FT-IR, FT-Raman, UV and NMR) investigation, conformational stability, NLO properties, HOMO-LUMO and NBO analysis of hydroxyquinoline derivatives by density functional theory calculations. **Spectrochimica Acta. Part A, Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, v. 114, p. 449–474, out. 2013.

PRESTES, R. C. Colágeno e Seus Derivados: Características e Aplicações em Produtos Cárneos. **Journal of Health Sciences**, v. 15, n. 1, 2013.

PRESTES, R. C. Colágeno e Seus Derivados: Características e Aplicações em Produtos Cárneos. **Journal of Health Sciences**, v. 15, n. 1, 2 jul. 2015.

QIU, Y. et al. Collagen Gly missense mutations: Effect of residue identity on collagen structure and integrin binding. **Journal of Structural Biology**, v. 203, n. 3, p. 255–262, set. 2018.

RODRIGUES, V. **Análises dos efeitos do colágeno bovino e derivados na proliferação celular e biossíntese de colágeno em fibroblastos humanos**. text—[s.l.] Universidade de São Paulo, 2 mar. 2009.

RODRIGUEZ, A. G. et al. Bioensaio dom Artemia Salina para Detecção de Toxinas em Alimentos Vegetais. **Revista EVS - Revista de Ciências Ambientais e Saúde**, v. 36, n. 4, p. 795–808, 2009.

SADER, M. S. et al. Production and in vitro characterization of 3D porous scaffolds made of magnesium carbonate apatite (MCA)/anionic collagen using a biomimetic approach. **Materials Science & Engineering. C, Materials for Biological Applications**, v. 33, n. 7, p. 4188–4196, out. 2013.

SAITO, N. et al. Interstitial fluid flow-induced growth potential and hyaluronan synthesis of fibroblasts in a fibroblast-populated stretched collagen gel culture. **Biochimica Et Biophysica Acta. General Subjects**, v. 1861, n. 9, p. 2261–2273, set. 2017.

SANTOS, A. M. D. ESTUDO SOBRE A EFICÁCIA DO AGE E HIDROCOLOIDE NO TRATAMENTO DE FERIDAS SUPERFICIAIS COM OU SEM INFECÇÃO. **Caderno de Graduação - Ciências Biológicas e da Saúde - UNIT**, v. 4, n. 2, p. 25, 22 nov. 2017.

SCHRIEBER, R.; GAREIS, H. **Gelatine Handbook: Theory and Industrial Practice**. 1. ed. [s.l.] Wiley-VCH, 2007.

SENA, L. Á. **PRODUÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE COMPÓSITOS HIDROXIAPATITA-COLÁGENO PARA APLICAÇÕES BIOMÉDICAS**. Rio de Janeiro, 2004.

SEPPÄNEN, A. et al. Distribution of collagen XVII in the human brain. **Brain Research**, v. 1158, p. 50–56, 16 jul. 2007.

SEPPINEN, L.; PIHLAJANIEMI, T. The multiple functions of collagen XVIII in development and disease. **Matrix Biology: Journal of the International Society for Matrix Biology**, v. 30, n. 2, p. 83–92, mar. 2011.

SHEN, G. et al. Forward deviation of the mandibular condyle enhances endochondral ossification of condylar cartilage indicated by increased expression of type X collagen. **Archives of Oral Biology**, v. 51, n. 4, p. 315–324, abr. 2006.

SHOULDERS, M. D.; RAINES, R. T. Collagen Structure and Stability. **Annual Review of Biochemistry**, v. 78, n. 1, p. 929–958, 2009.

SIEGLE, A. F.; TRAPP, O. Improving the signal-to-noise ratio in gel permeation chromatography by Hadamard encoding. **Journal of Chromatography. A**, v. 1448, p. 93–97, 27 maio 2016.

SILVA, R. DE S. G. DA et al. Extração de gelatina a partir das peles de cabeças de carpa comum. **Ciência Rural**, v. 41, n. 5, p. 904–909, 2010.

SILVA, M. DO S. M. L. et al. Use of non-conventional coverage in ischemic wound treatment in patients with sickle cell anemia: case study. **Online Brazilian Journal of Nursing**, v. 8, n. 3, 23 set. 2009.

SILVA, T. F. DA [UNESP; PENNA, A. L. B. [UNESP. Colágeno: características químicas e propriedades funcionais. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, p. 530–539, 2012.

SINGH, P. et al. Isolation and characterisation of collagen extracted from the skin of striped catfish (*Pangasianodon hypophthalmus*). **Food Chemistry**, v. 124, n. 1, p. 97–105, 1 jan. 2011.

SIONKOWSKA, A. The influence of UV light on collagen/poly(ethylene glycol) blends. **Polymer Degradation and Stability**, v. 2, n. 91, p. 305–312, 2006.

SONG, H. J. et al. Fabrication of a pumpless, microfluidic skin chip from different collagen sources. **Journal of Industrial and Engineering Chemistry**, v. 56, p. 375–381, dez. 2017.

SOUSA, L. S.; PIMENTEL, M. M.; SOUZA, M. A. B. DE. . In: CONGRESSO BRASILEIRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE. Campina Grande, 2017. Disponível em: <<https://editorarealize.com.br/revistas/conbracis/trabalhos/TRABALHO_EV071_MD1_SA4_ID1385_30042017093925.pdf>. Acesso em: 13 jul. 2018

SOUZA, A. R. C. DE. **USO DA ARTEMIA SALINA COMO BIOINDICADOR NA AVALIAÇÃO ECOTOXICOLÓGICA DO FÁRMACO CLORIDRATO DE CIPROFLOXACINA EM SOLUÇÃO SINTÉTICA TRATADA POR PROCESSO DE ELETROCOAGULAÇÃO**. . In: VI CONGRESSO BRASILEIRO DE GESTÃO AMBIENTAL. Porto Alegre: nov. 2011 Disponível em: <<http://www.ibeas.org.br/congresso/Trabalhos2015/II-007.pdf>>. Acesso em: 1 jul. 2018

SUN, L. et al. Characterization of Pacific cod (*Gadus macrocephalus*) skin collagen and fabrication of collagen sponge as a good biocompatible biomedical material. **Process Biochemistry**, v. 63, p. 229–235, 1 dez. 2017.

TAO, G. et al. Collagen XIV is important for growth and structural integrity of the myocardium. **Journal of Molecular and Cellular Cardiology**, v. 53, n. 5, p. 626–638, nov. 2012.

TAVAKOLIPOUR, H. Extraction and Evaluation of Gelatin from Silver Carp Waste. p. 6, 2011.

THEOCHARIDIS, G. et al. Type VI Collagen Regulates Dermal Matrix Assembly and Fibroblast Motility. **The Journal of Investigative Dermatology**, v. 136, n. 1, p. 74–83, jan. 2016.

TSUZUKI, T. et al. Hyperocclusion stimulates the expression of collagen type XII in periodontal ligament. **Archives of Oral Biology**, v. 66, p. 86–91, jun. 2016.

VARLEY, M. C. et al. Cell structure, stiffness and permeability of freeze-dried collagen scaffolds in dry and hydrated states. **Acta Biomaterialia**, v. 33, p. 166–175, mar. 2016.

VEDHANAYAGAM, M. et al. Role of nanoparticle size in self-assemble processes of collagen for tissue engineering application. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 99, p. 655–664, 1 jun. 2017.

VEERURAJ, A. et al. Isolation and characterization of collagen from the outer skin of squid (*Doryteuthis singhalensis*). **Food Hydrocolloids**, v. 43, p. 708–716, jan. 2015.

VERSTEEGDEN, L. R. et al. Tubular collagen scaffolds with radial elasticity for hollow organ regeneration. **Acta Biomaterialia**, v. 52, p. 1–8, 01 2017.

WAIDMAN, M. A. P. et al. O cotidiano do indivíduo com ferida crônica e sua saúde mental. **Texto & Contexto - Enfermagem**, v. 20, n. 4, p. 691–699, dez. 2011.

WIEDEMANN, S. G.; MCGAHAN, E. J.; MURPHY, C. M. Resource use and environmental impacts from Australian chicken meat production. **Journal of Cleaner Production**, Towards eco-efficient agriculture and food systems: selected papers addressing the global challenges for food systems, including those presented at the Conference “LCA for Feeding the planet and energy for life” (6-8 October 2015, Stresa & Milan Expo, Italy). v. 140, p. 675–684, 1 jan. 2017.

WINDLER, C. et al. A type VII collagen subdomain mutant is thermolabile and shows enhanced proteolytic degradability — Implications for the pathogenesis of recessive dystrophic epidermolysis bullosa? **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease**, v. 1863, n. 1, p. 52–59, 1 jan. 2017.

WŁODARCZYK-BIEGUN, M. K.; DEL CAMPO, A. 3D bioprinting of structural proteins. **Biomaterials**, v. 134, p. 180–201, 1 jul. 2017.

WOLF, K. et al. Collagen-based cell migration models in vitro and in vivo. **Seminars in Cell & Developmental Biology**, v. 20, n. 8, p. 931–941, out. 2009.

YAN, T. et al. Biodegradable collagen sponge reinforced with chitosan/calcium pyrophosphate nanoflowers for rapid hemostasis. **Carbohydrate Polymers**, v. 170, p. 271–280, 15 ago. 2017.

YAO, Y.; LENHOFF, A. M. Determination of pore size distributions of porous chromatographic adsorbents by inverse size-exclusion chromatography. **Journal of Chromatography. A**, v. 1037, n. 1–2, p. 273–282, 28 maio 2004.

ZHANG, Y. Z. et al. Characterization of the Surface Biocompatibility of the Electrospun PCL-Collagen Nanofibers Using Fibroblasts. **Biomacromolecules**, v. 6, n. 5, p. 2583–2589, 1 set. 2005.

ZHOU, Y. et al. Modification of collagen with three novel tannages, sulfonated calix[4]arenes. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 116, p. 1004–1010, set. 2018.