



UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ

CENTRO DE CIÊNCIAS

DEPARTAMENTO DE QUÍMICA ORGÂNICA E INORGÂNICA

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

GABRIELA IBIAPINA FIGUEIREDO

ELABORAÇÃO DE COMPÓSITOS DE NANOHIIDROXIAPATITA E COLÁGENO
PROVENIENTE DE RESÍDUOS DO BENEFICIAMENTO DE TILÁPIA DO NILO
(*Oreochromis niloticus*)

FORTALEZA

2015

GABRIELA IBIAPINA FIGUEIREDO

ELABORAÇÃO DE COMPÓSITOS DE NANOHIĐROXIAPATITA E COLÁGENO
PROVENIENTE DE RESÍDUOS DO BENEFICIAMENTO DE TILÁPIA DO NILO
(*Oreochromis niloticus*)

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química da Universidade Federal do Ceará como requisito parcial para obtenção do Título de Mestre em Química.

Área de Concentração: Química

Orientação: Prof.^a Dr.^a Morsyleide de Freitas Rosa.

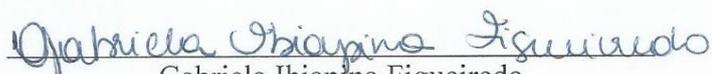
FORTALEZA

2015

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal do Ceará
Biblioteca de Ciências e Tecnologia

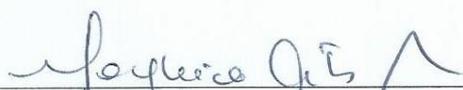
-
- F49e Figueiredo, Gabriela Ibiapina.
Elaboração de compósitos de nanohidroxiapatita e colágeno proveniente de resíduos do beneficiamento de tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) / Gabriela Ibiapina Figueiredo. – 2015.
70 f. : il. color., enc. ; 30 cm.
- Mestrado (Dissertação) – Universidade Federal do Ceará, Centro de Ciências, Departamento de Química Orgânica e Inorgânica, Programa de Pós-Graduação em Química, Fortaleza, 2015.
Orientação: Profa. Dra. Morsyleide de Freitas Rosa.
1. Colágeno. 2. Tilápia (Peixe). 3. Química ambiental. 4. Polissacarídeo. 5. Fosfato de cálcio. I.
Título.
-

Esta Dissertação foi aprovada como parte dos requisitos necessários à obtenção do Grau de Mestre em Química, área de concentração Química, outorgada pela Universidade Federal do Ceará, em cuja Biblioteca de Ciências e Tecnologia/UFC encontra-se à disposição dos interessados.

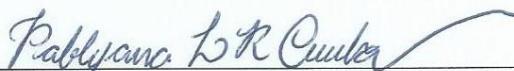

Gabriela Ibiapina Figueiredo

DISSERTAÇÃO APROVADA EM: 13/03/2015.

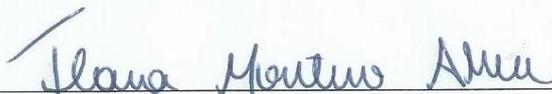
EXAMINADORES:



Dra. Morsyleide de Freitas Rosa
Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária – EMBRAPA



Profa. Dra. Pablyana Leila Rodrigues da Cunha
Universidade Federal do Ceará – UFC



Dra. Flavia Oliveira Monteiro da Silva Abreu
Universidade Estadual do Ceará – UECE

Dedico esse trabalho a Deus, por me iluminar nos momentos de dúvidas e me dar saúde e força para seguir em frente. Aos meus pais, Cláudio e Suelde, por me amarem incondicionalmente. Ao meu noivo, Augusto, por todo o incentivo e apoio durante esses anos. Finalmente, aos meus orientadores, Men e Morsy, por acreditarem em mim quando nem eu mesma acreditei.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente a Deus por, nos momentos de dúvidas, ter me iluminado, me dado forças e, principalmente, saúde para seguir em frente.

Aos meus pais, Cláudio e Suelde, por todo o amor incondicional que me dedicam. Obrigada por sempre me apoiarem e me fazerem acreditar que eu era capaz de conquistar tudo o que eu desejasse.

A minha irmã, Rafaela, por toda a torcida, conversas, risadas e apoio. Sei que não importa a situação poderei sempre contar com você.

Ao, meu noivo, Augusto, por ter estado ao meu lado durante esses 20 anos. Obrigada por todo o apoio e incentivo que você me deu durante os últimos 7 anos. Você me fez uma pessoa mais forte e corajosa para correr atrás dos meus sonhos.

A todos os meus familiares, por me mostrarem que família é a base de tudo. Obrigada especial a Renata e Aline, por sempre vibrarem com todas as minhas conquistas.

Aos meus amigos de UFC, Onassis, Dejane, Rafael e Diego por, desde a época da graduação, me ajudarem e estarem ao meu lado tornando o dia-a-dia muito melhor.

As minhas amigas do laboratório Gleyciara, Niedja e Menta, por todos os momentos juntas em que nossas risadas deixaram os dias mais leves.

Ao meu orientador, Men de Sá, por sempre acreditar em mim e me incentivar em todos os momentos. Quando alguém me pergunta do senhor sempre digo que, se existe mega-sena de orientadores, eu tirei a sorte grande.

A minha também orientadora Morsy, por toda a delicadeza e compreensão diárias. Junto com o Men, você acreditou em mim quando eu mais precisei de forças.

A todos do Laboratório de Tecnologia da Biomassa por transformar o ambiente de trabalho em uma casa.

A Professora Judith por ter me recebido como orientanda no princípio e sempre ter sido solícita a todas as ajudas requeridas.

A Professora Mozarina exemplo maior de didática e amor por ser professora. Obrigada por todos os ensinamentos e apoio.

Aos professores Bartolomeu e Pablyana pelas contribuições tão importantes durante o meu Exame Geral de Conhecimentos.

A Embrapa Agroindústria Tropical por ter possibilitado o desenvolvimento do trabalho em suas instalações.

A UFC, ao Programa de Pós-Graduação em Química e a Capes pela possibilidade de realização desse mestrado.

Ao Laboratório de Polímeros (UFRN), Núcleo de Plataformas Tecnológicas (FIOCRUZ), Laboratório Multiusuário de Química de Produtos Naturais (EMBRAPA), Laboratório de Microscopia (UFC), Laboratório de Raios-X (UFC), Laboratório de Microscopia (EMBRAPA) por todas as análises realizadas.

A todos que, direta ou indiretamente, torceram por mim e contribuíram para que eu chegasse a esse dia.

Muito Obrigada!

“Construí amigos, enfrentei derrotas, venci obstáculos, bati na porta da vida e disse-lhe: Não tenho medo de vivê-la.” (Augusto Cury)

RESUMO

A química sustentável, ou Química Verde, visa o aprimoramento dos processos, com o objetivo da geração cada vez menor de resíduos, efluentes tóxicos e de gases indesejáveis ao ambiente. Um dos seus princípios fala sobre processos que usem matérias-primas de fontes renováveis para obtenção de novos produtos. Os resíduos do pescado descartados no meio ambiente sem controle podem causar danos como a eutrofização de corpos d'água. Uma alternativa para agregar valor a esses resíduos é a extração de colágeno. Existem várias alternativas para o uso do colágeno, destacando-se a área de engenharia de tecidos, onde este está sendo utilizado para o desenvolvimento de suportes, seja isoladamente ou em combinação com outros materiais. Compósitos de colágeno e hidroxiapatita têm sido amplamente estudados. As aplicações estendem-se desde a ortopedia e traumatologia, como também na odontologia. Este trabalho propõe o uso de peles de Tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*), oriundas de resíduos do beneficiamento do pescado, para obtenção de colágeno e posterior obtenção de compósitos com nanohidroxiapatita, com potencial de aplicação como enxerto ósseo. As peles foram inicialmente caracterizadas quanto aos teores de umidade, proteínas, lipídeos e cinzas. Foi realizada a extração do colágeno utilizando ácido acético 0,5 mol.L⁻¹ e sua caracterização por Microscopia Eletrônica de Varredura, Espectroscopia na Região do Infravermelho com Transformada de Fourier, Espectroscopia de Absorção UV-VIS, Potencial Zeta, Temperatura de Desnaturação e Calorimetria Exploratória Diferencial. Na elaboração do compósito, por formação da nanohidroxiapatita depositada sobre a superfície da matriz colagenosa, utilizou-se soluções de ácido fosfórico 0,05 mMol.L⁻¹, cloreto de cálcio 50 mMol.L⁻¹ e hidróxido de sódio 0,1 Mol.L⁻¹ como precursores, sendo o compósito caracterizado por Espectroscopia na Região do Infravermelho com Transformada de Fourier, Microscopia Eletrônica de Transmissão, Microscopia Eletrônica de Varredura, Espectroscopia de Energia Dispersiva e Difração de Raios-X. Foi possível verificar que o colágeno manteve a integridade da tripla hélice preservada não apresentando perfil de desnaturação. A microscopia eletrônica de varredura permitiu investigar a morfologia das fibras de colágeno e observar a deposição das partículas de nanohidroxiapatita. O compósito obtido apresentou características semelhantes às dos ossos naturais, como relação Ca/P < 1,67, caracterizando uma hidroxiapatita deficiente em cálcio, presença de carbonatos em sua composição, baixa cristalinidade e ainda cristais de hidroxiapatita em escala nanométrica.

Palavras-chave: Colágeno. Tilápia (peixe). Química Ambiental. Fosfato de Cálcio.

ABSTRACT

Sustainable chemistry, or Green Chemistry, aims to improve processes, with the goal of becoming less waste, toxic waste and unwanted gases to the environment. One of its principles talks about processes that use raw materials from renewable sources to obtain new products. The fish waste discarded in the environment without control can cause damage such as eutrophication of water bodies. An alternative to add value to this waste is collagen extraction. There are several alternatives to the use of collagen, especially tissue engineering, where it is being used for the development of media, either alone or in combination with other materials. Collagen composite and hydroxyapatite have been widely studied. Applications extend from orthopedics and traumatology, as also in dentistry. This paper proposes the use of Nile Tilapia skins (*Oreochromis niloticus*), derived from fish processing waste, to obtain collagen and subsequently obtain composites nanohydroxiapatita, with potential application as bone graft. The skins were initially characterized as the moisture, protein, lipid and ash. Collagen extraction was performed using acetic acid 0.5 mol.L^{-1} and its characterization by Scanning Electron Microscopy, Spectroscopy Infrared Region with Fourier Transform, Absorption Spectroscopy UV-VIS, Zeta Potential, denaturation temperature and Differential Scanning Calorimetry. In preparing the composite for forming the nano-hydroxyapatite deposited on the surface of the collagenous matrix was used phosphoric acid solution 0.05 mmol.L^{-1} calcium chloride and 50 mmol.L^{-1} sodium hydroxide 0.1 mol.L^{-1} as precursors, with the composite characterized by Infrared Spectroscopy in the Region with Fourier Transform, Transmission Electron Microscopy, Scanning Electron Microscopy, Energy Dispersive Spectroscopy and X-ray diffraction. We found that the collagen maintained the integrity of the triple helix preserved showing no denaturation profile. The scanning electron microscopy allowed to investigate the morphology of collagen fibers and observe the deposition of particles of nanohydroxiapatita. The composite obtained showed characteristics similar to those of natural bone, such as $\text{Ca} / \text{P} < 1.67$ compared, featuring a deficient hydroxyapatite calcium, the presence of carbonates in its composition, low crystallinity and even hydroxyapatite crystals at the nanometer scale.

Keywords: Collagen. Tilapia (fish). Environmental Chemistry. Calcium Phosphate.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Fotografia de pescado de Tilápia do Nilo (<i>Oreochromis Niloticus</i>).....	19
Figura 2 – Distribuição e tipos de colágeno.	21
Figura 3- Fórmula estrutural dos principais aminoácidos presentes no colágeno: (a) Glicina; (b) Prolina; (c) 4 – hidroxiprolina.	22
Figura 4– Processo de formação, organização e estrutura de colágeno.	23
Figura 5 - Representação esquemática do tratamento do colágeno com o glutaraldeído.	26
Figura 6- Estrutura e composição óssea em ressaltando as diferentes escalas de tamanho.	27
Figura 7 – Representação esquemática da estrutura cristalina da HA estequiométrica.	29
Figura 8– Representação esquemática da estrutura cristalina da HA estequiométrica ao longo do eixo c.	29
Figura 9- Fluxograma de extração do colágeno.	35
Figura 10- Fluxograma de elaboração do compósito de colágeno e nanohidroxiapatita.	38
Figura 11 – Imagens de MEV do colágeno obtido: (a) Aumento 50x; (b) Aumento 200x; (c) Aumento 1000x; (d) Aumento 1000x com destaque para as fibrilas.	42
Figura 12 - Espectro de FTIR para o colágeno de pele de tilápia.	43
Figura 13- Espectro de absorção UV-VIS do colágeno de pele de tilápia.	45
Figura 14- Curva de variação do Potencial Zeta vs pH.	46
Figura 15 – Gráfico de temperatura de início de desnaturação para o colágeno obtido pele de Tilápia do Nilo.....	47
Figura 16 – Gráfico de variação de fluxo de calor em função da temperatura para o colágeno.	48
Figura 17 - Espectro de FTIR para o compósito obtido.	50
Figura 18 – Imagens de MEV do compósito de colágeno/nanohidroxiapatita: (a) Aumento 500x; (b) Aumento 600x.	52
Figura 19 - Espectro de EDS dos compósitos de colágeno/ nanohidroxiapatita.	53
Figura 20 - Micrografia por MET dos nanocristais de hidroxiapatita depositadas sobre o colágeno presente no compósito.	54
Figura 21 – Difratoograma de Raios-X do compósito de colágeno e nanohidroxiapatita.	55

LISTA DE TABELA

Tabela 1– Propriedades dos fosfatos de cálcio biologicamente relevantes.	28
Tabela 2 - Composição da pele de tilápia, em base úmida, quanto aos teores de umidade, lipídeos, proteínas e cinzas.	41
Tabela 3 - Principais grupamentos observados no espectro de infravermelho.	43
Tabela 4 - Principais grupamentos observados no espectro de infravermelho para o compósito de colágeno/nanohidroxiapatita.	49
Tabela 5 - Análise química por EDS do compósito de colágeno e nanohidroxiapatita.	53

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	15
2. OBJETIVOS	17
2.1. OBJETIVO GERAL	17
2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	17
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	18
3.1. TILÁPIA E SEUS RESÍDUOS	18
3.1.1. Produção de pescado	18
3.1.2. Tilápia do Nilo (<i>Oreochromis niloticus</i>)	18
3.1.3. Resíduos do beneficiamento da tilápia	19
3.2. COLÁGENO	20
3.2.1. Estrutura e composição do colágeno	20
3.2.2. Métodos de obtenção do colágeno	24
3.2.3. Aplicações do colágeno	24
3.2.4. Fontes de colágeno tipo I	25
3.2.5. Uso de agente reticulante	26
3.3. FOSFATOS DE CÁLCIO	27
3.3.1. Hidroxiapatita (HA)	28
3.3.2. Métodos de obtenção de HA	31
3.4. MATERIAIS NANOCOMPÓSITOS	32
3.4.1. Compósitos de colágeno e nanohidroxiapatita	33
4. MATERIAIS E MÉTODOS	34
4.1. MATÉRIA-PRIMA E REAGENTES	34
4.2. METODOLOGIA	34
4.2.1. Caracterização das peles de tilápia	34
4.2.2. Extração do colágeno proveniente da pele de Tilápia do Nilo (<i>Oreochromis Niloticus</i>)	34
4.2.2. Caracterização da pele de tilápia	36
4.2.3. Caracterização do colágeno extraído de pele de Tilápia do Nilo (<i>Oreochromis niloticus</i>)	36
4.2.3.1. Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)	36
4.2.3.2. Espectroscopia na Região do Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR)	36
4.2.3.3. Espectroscopia de Absorção UV-VIS	36
4.2.3.4. Potencial Zeta (ζ)	37
4.2.3.5. Temperatura de Desnaturação por Viscosimetria	37
4.2.3.6. Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC)	37
4.2.4. Produção do compósito de colágeno e nanohidroxiapatita	38
4.2.5. Caracterização do compósito de colágeno e nanohidroxiapatita	39
4.2.5.1. Espectroscopia na Região do Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR)	39
4.2.5.2. Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)	39
4.2.5.3. Espectroscopia de Energia Dispersiva (EDS)	39
4.2.5.4. Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET)	39
4.2.5.5. Difração de Raios-X (DRX)	40
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	41
5.1. CARACTERIZAÇÃO DAS PELES DE TILÁPIA QUANTO AOS TEORES DE UMIDADE, CINZAS, PROTEÍNAS E LIPÍDEOS	41
5.2. CARACTERIZAÇÃO DO COLÁGENO EXTRAÍDO DE PELE DE TILÁPIA DO NILO (<i>OREOCHROMIS NILOTICUS</i>)	41
5.2.1. Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)	41
5.2.2. Espectroscopia na Região do Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR)	42

5.2.3. Espectroscopia de Absorção UV-VIS.....	45
5.2.4. Potencial Zeta (ζ)	46
5.2.5. Temperatura de Desnaturação.....	47
5.2.6. Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC)	48
5.3. CARACTERIZAÇÃO DO COMPÓSITO DE COLÁGENO/NANOHIIDROXIAPATITA	49
5.3.1. Espectroscopia na Região do Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR).....	49
5.3.2. Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV).....	52
5.3.3. Espectroscopia de Energia Dispersiva (EDS).....	53
5.3.4. Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET)	54
5.3.5. Difração de Raios-X (DRX)	55
6. CONCLUSÃO.....	57
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	58

1. INTRODUÇÃO

Dentro dos princípios da necessidade de um desenvolvimento sustentável, tem-se como regra que a química deve manter e melhorar a qualidade de vida. O grande desafio é a continuidade do desenvolvimento, diminuindo os danos causados ao meio ambiente. Tal fato requer uma nova conduta química para o aprimoramento dos processos, com o objetivo fundamental da geração cada vez menor de resíduos e efluentes tóxicos, bem como da menor produção de gases indesejáveis ao ambiente. Este novo caminho a ser delineado pela química é denominado como química sustentável ou química verde (SILVA *et al.*, 2005).

Um dos princípios da Química Verde fala sobre processos que usem matérias-primas de fontes renováveis, como, por exemplo, a reutilização dos resíduos gerados ao longo do processo agroindustrial como fonte de matéria-prima para obtenção de novos produtos. Segundo Rosa *et al.* (2011), a geração de resíduos está associada a diversos fatores: desde o desperdício no uso de insumos, como também às perdas entre a produção e o consumo, e ainda aos materiais que, gerados ao longo da cadeia agroindustrial, não possuem valor econômico evidente.

De acordo com o último boletim estatístico da pesca e aquicultura do Ministério da Pesca e Aquicultura, a produção de pescado extrativo de tilápia no Brasil durante o ano de 2011 foi superior a nove mil toneladas (BRASIL, 2013). As indústrias de beneficiamento de pescado visam, principalmente, a produção de filés, gerando um grande volume de resíduos (CARVALHO *et al.*, 2006). Esses resíduos, se descartados no meio ambiente sem controle, podem causar danos como, por exemplo, a eutrofização de corpos d'água (MACEDO e SIPAÚBA-TAVARES, 2010).

Uma alternativa para agregar valor a esse resíduo é a obtenção de colágeno proveniente da pele da tilápia. Historicamente, colágeno de animais terrestres, como bovinos e suínos, tem sido bastante utilizados. No Brasil, a maior parte do colágeno é proveniente dos subprodutos da indústria de carne, em função da elevada produção brasileira de carne para exportação. Porém, o surto de Encefalopatia Espongiforme Bovina (EEB) e questões religiosas apresentaram-se como obstáculos para o contínuo uso do colágeno originário dessas fontes (SADOWSKA *et al.*, 2003; SILVA e PENNA, 2012). Assim, fontes alternativas de colágeno, como resíduos do processamento de pescado, têm recebido bastante atenção.

Existem várias alternativas para o uso do colágeno, como, por exemplo, a utilização em indústrias alimentícias para melhorar a estabilidade, elasticidade e consistência dos alimentos. Também podem ser usados para encapsulamento e formação de película comestível, tornando-os de interesse para a indústria farmacêutica de embalagens e indústrias fotográficas (GÓMEZ-GUILLÉN *et al.*, 2011).

Outra possibilidade do uso do colágeno está na área biomédica. Na engenharia de tecidos, o colágeno está sendo utilizado para o desenvolvimento de suportes, seja isoladamente ou em combinação com outros biomateriais, para a reconstrução da pele, como vasos sanguíneos artificiais, válvulas cardíacas, enxertos ósseos, cartilagens e substituição de ligamentos, etc. A utilização de colágeno em aplicações biomédicas inclui a produção de curativos, implantes vítreos e como veículos para a liberação de fármacos (PATI *et al.*, 2010).

Compósitos de colágeno e hidroxiapatita têm sido amplamente estudados. As aplicações estendem-se desde a ortopedia e traumatologia; traumatismos raquimedulares e coluna cervical; tumores músculo-esquelético, entre outras aplicações e na odontologia, nos casos de doenças periodontais, para correções buço-maxilofaciais, implantes dentários, preenchimento de cavidades císticas ou mesmo aumentos de rebordo alveolar, além de outras aplicações (COSTA *et al.*, 2009).

No presente trabalho, resíduos de pele de Tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) são usados como fonte de matéria-prima para a obtenção de colágeno como possibilidade de uso como matriz polimérica para elaboração de compósitos com nanohidroxiapatita, estabelecendo uma potencial alternativa de aplicação como enxerto ósseo.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo Geral

Explorar as potencialidades do colágeno, obtido através de resíduos do beneficiamento da Tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*), como matriz polimérica para a elaboração de compósitos com nanohidroxiapatita, visando a produção de um material com potencial utilização como enxerto ósseo.

2.2. Objetivos Específicos

Caracterizar as peles utilizadas como matérias-primas para a extração do colágeno;

Extrair o colágeno presente na pele de tilápia por via ácida e precipitação salina;

Caracterizar o colágeno obtido através de análises morfológicas, estruturais, térmicas e de estabilidade de superfície;

Produzir um compósito de colágeno com nanohidroxiapatita;

Caracterizar compósito obtido através de análises morfológicas, estruturais e cristalográficas.

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1. Tilápia e seus resíduos

3.1.1. Produção de pescado

Segundo o último boletim estatístico da pesca e agricultura do Ministério da Pesca e Aquicultura, a produção mundial de pescado (proveniente tanto da pesca extrativa quanto da aquicultura) atingiu aproximadamente 168 milhões de toneladas em 2010. Os maiores produtores foram a China, com aproximadamente 63,5 milhões de toneladas, a Indonésia, com 11,7 milhões de toneladas, a Índia, com 9,3 milhões de toneladas e o Japão, com cerca de 5,2 milhões de toneladas. Neste cenário, o Brasil produziu 1.264.765 toneladas de pescado ocupando o 19º lugar no ranking geral. A produção de pescado nacional para o ano de 2011 foi de 1.431.974,4 toneladas, registrando-se um incremento de aproximadamente 13,2% em relação a 2010. Ainda em 2011, a região Nordeste continuou registrando a maior produção de pescado do país, com 454.216,9 toneladas, respondendo por 31,7% da produção nacional. O estado do Ceará registrou a 3ª maior produção de pescados da região, com um total de 98.256,8 toneladas, ficando atrás apenas dos estados do Maranhão e da Bahia (BRASIL, 2013).

Destaca-se a produção de Tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) que, em 2011, correspondeu a 46,6% produção nacional de aquicultura continental, com 256.824,1 toneladas e ainda houve a pesca extrativista de 9,6 mil toneladas (BRASIL, 2013). No estado do Ceará, neste mesmo ano, foram produzidas em torno de 20 mil toneladas de Tilápia do Nilo, conforme dados da Associação Cearense de Aquicultores (Aceaq) (MAZZA, 2012).

3.1.2. Tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*)

A tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) (Figura 1) pertence à ordem dos Perciformes e família Cichlidae, é originária da bacia do rio Nilo, no Leste da África, encontrando-se amplamente disseminada nas regiões tropicais e subtropicais, como em Israel, no Sudeste Asiático (Indonésia, Filipinas e Formosa) e no Continente Americano (USA, México, Panamá e toda a América do Sul). Possui como características principais listras verticais na nadadeira caudal, apresenta coloração cinza-azulada, hábito alimentar fitoplanctófago e possui escamas (PADUA, 2001; CARVALHO, 2006). A partir da década de 70, a tilápia do Nilo chegou ao Brasil, sendo introduzida primeiramente no Nordeste, pelo Departamento Nacional de Obras

Contra a Seca (DNOCS), e expandiu para todo território nacional, passando então a ser cultivada desde a bacia do rio Amazonas até o Rio Grande de Sul (BOSCOLO *et al.*, 2001).

Figura 1 – Fotografia de pescado de Tilápia do Nilo (*Oreochromis Niloticus*)



Fonte: Elaborada pela autora.

3.1.3. Resíduos do beneficiamento da tilápia

Resistência a doenças, qualidade da carne e, principalmente, o crescimento rápido são características que fazem tilápia uma das espécies de peixes mais cultivados no mundo (ALLAMAN *et al.*, 2013). Devido à alta produção, um grande volume de resíduos é gerado a partir do beneficiamento da tilápia.

O termo resíduo refere-se às sobras e aos subprodutos do processamento dos alimentos que são de baixo valor agregado (ARRUDA, 2004). No caso específico da tilápia, no Brasil, o rendimento de filetagem pode variar de 17% a 30%, embora já existam linhagens melhoradas de tilápia cujo rendimento chega a 34%-45% (MORAIS *et al.*, 2013). Segundo Vidotti e Gonçalves (2006) os resíduos incluem cabeça, carcaça, vísceras, pele e escamas. Esses resíduos, se descartados no meio ambiente sem controle, podem causar danos como, por exemplo, a eutrofização de corpos d'água.

O termo eutrofização é utilizado, na limnologia, para indicar o fenômeno de transformação de lagos para uma maior produtividade biológica, sendo um fenômeno associado ao aumento excessivo da produção de biomassa de produtores primários, geralmente causada pela elevada concentração de nutrientes. A eutrofização artificial (cultural

ou antrópica) é induzida pelo homem e pode ter diferentes origens, como: efluentes domésticos, industriais e atividades agrícolas, incluindo ainda os efluentes de sistemas de criação de organismos aquáticos. O crescimento demográfico e o aumento das atividades industriais e da descarga de nutrientes nos sistemas aquáticos vêm acelerando sensivelmente a evolução deste processo. O aumento das concentrações de nitrogênio e fósforo são as principais causas da eutrofização em ecossistemas continentais, onde pode haver rápido desenvolvimento de algas e crescimento excessivo de plantas aquáticas, como cianobactérias e *Eichhornia crassipes* ou *Pistia stratiotes*, respectivamente, levando a uma conseqüente diminuição na penetração de luz e profundas mudanças no metabolismo de todo o ecossistema e nas concentrações de oxigênio nas camadas superiores (MACEDO e SIPAÚBA-TAVARES, 2010).

Assim, visando o reaproveitamento desses resíduos, que são ricos em colágeno (ZENG *et al.*, 2009), a extração deste se apresenta como uma potencial alternativa de agregação de valor aos mesmos.

3.2. Colágeno

3.2.1. Estrutura e composição do colágeno

O colágeno, a maior proteína estrutural em animais vertebrados e invertebrados, contém cadeias peptídicas dos aminoácidos glicina, prolina, lisina, hidroxilisina, hidroxiprolina e alanina e corresponde a cerca de 30% do total de proteínas no corpo e a 6% em peso. Atualmente, pelo menos 29 tipos diferentes de colágeno, que são produzidos por mais de 30 genes, foram identificados. Cada tipo de colágeno difere consideravelmente na sua sequência, estrutura e função, e, portanto, eles são especificamente distribuídos nas peles, ossos, tendões, sistemas vasculares ou tecidos conjuntivos intramusculares, onde desempenham um papel na manutenção da estabilidade e integridade estrutural dos tecidos correspondentes e órgãos (LIU *et al.*, 2015; DHARA *et al.*, 2013). Na Figura 2 estão listados alguns dos diferentes tipos de colágeno e sua distribuição nos tecidos.

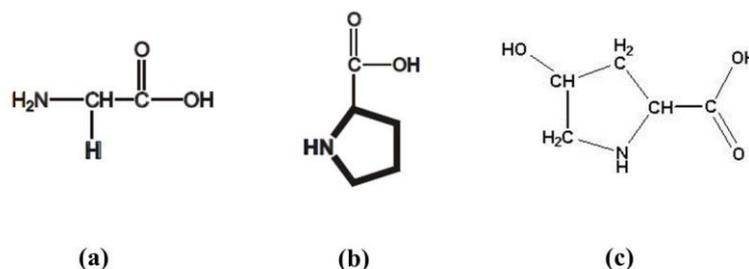
Figura 2 – Distribuição e tipos de colágeno.

Tipo de Colágeno	Distribuição no Tecido
I	Pele, tendão, osso, córnea, dentina, fibrocartilagem, grandes vasos, intestino, útero, derme, ligamentos
II	Cartilagem hialina e elástica, notocórdio e disco intervertebral
III	Grandes vasos, parede uterina, derme, intestino, válvula do coração, gengiva (geralmente coexiste com o tipo I exceto no osso, tendão e na córnea)
IV	Lâminas basais, cápsula do cristalino
V	Córnea, membranas da placenta, osso, grandes vasos, cartilagem hialina, gengiva
VI	Pele, músculo do coração
VII	Pele, placenta, pulmão, cartilagem, córnea
VIII	Produzido pelas células endoteliais
IX	Cartilagem
X	Cartilagem hipertrópica e mineralizada
XI	Cartilagem, disco intervertebral, humor vítreo
XII	Tendão embrionário de frango, ligamento periodontal bovino
XIII	Pele fetal, mucosa intestinal

Fonte: FRIESS, 1998.

A molécula básica do colágeno tem a forma de um bastão com comprimento e largura de aproximadamente 300 nm e 1,5 nm, respectivamente, e peso molecular de 300 kD. Estruturalmente contém três cadeias polipeptídicas α , cada uma constituída de mais de 1000 aminoácidos, que se unem para a formação do procolágeno. O aminoácido glicina possui o menor grupo R e sua repetição ocorre a cada três posições na sequência das cadeias da hélice. A sequência de aminoácidos no colágeno (Figura 3) é, em geral, uma unidade tripeptídica, glicina-X-prolina ou glicina-X-hidroxi-prolina, onde o X pode ser qualquer um dos 20 aminoácidos-padrão. Os aminoácidos hidroxilisina e hidroxiprolina, presentes na estrutura do colágeno, não são sintetizados, mas são formados por hidroxilação da prolina e lisina, pelas enzimas prolil-hidroxilase e lisil-hidroxilase, respectivamente, que se inicia nos ribossomos durante a tradução do mRNA do colágeno. Assim, o processo de hidroxilação é concluído após a formação da estrutura linear (CAMPOS, 2008; KOIDE *et al.*, 2005; SENA, 2004; SILVA e PENNA, 2012).

Figura 3- Fórmula estrutural dos principais aminoácidos presentes no colágeno: (a) Glicina; (b) Prolina; (c) 4 – hidroxiprolina.



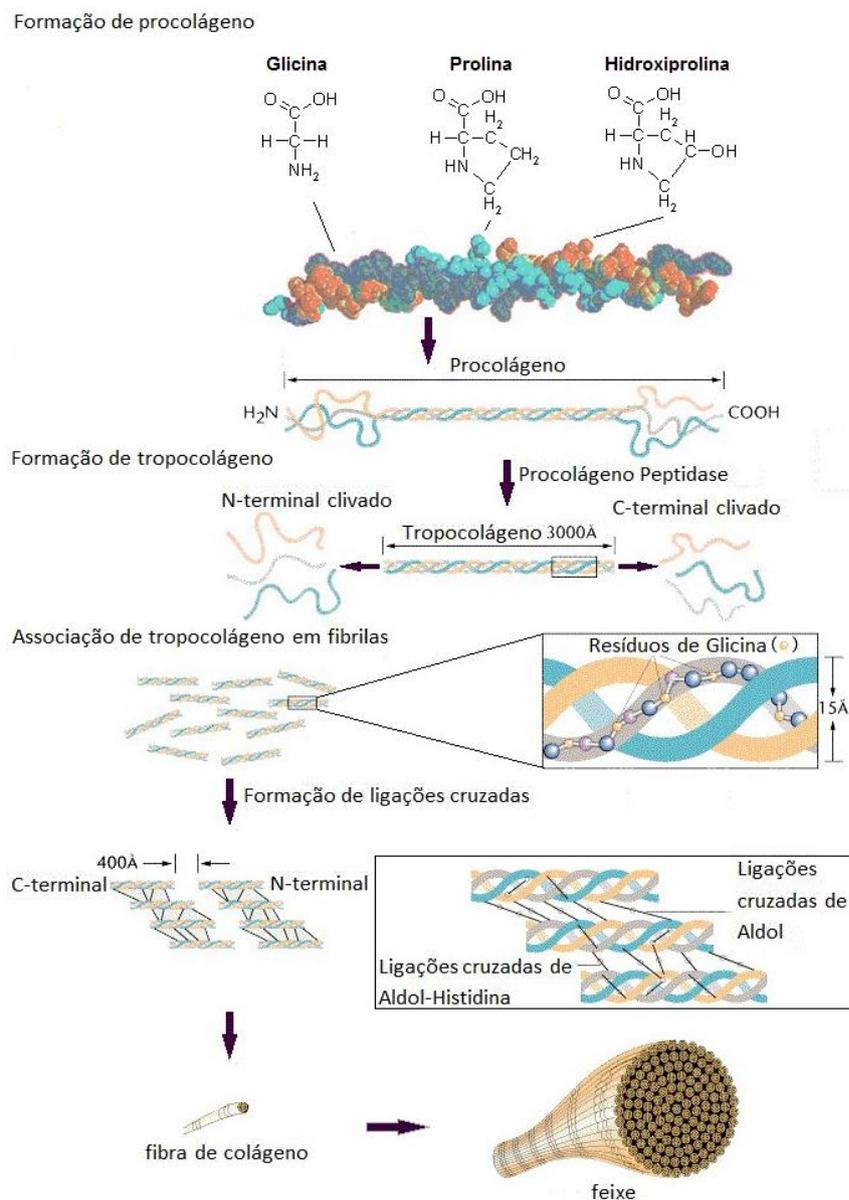
Fonte: PINHEIRO *et. al*, 2005.

O processo de formação do colágeno ocorre principalmente durante o preparo da regeneração e do desenvolvimento do tecido embrionário. As moléculas de colágeno são secretadas pelos fibroblastos na forma de procolágeno solúvel, que é ladeado por duas estruturas globulares de peptídeos contendo nitrogênio (N-) e carbono (C-) terminais (CANTY e KADLER, 2005). O procolágeno é secretado dentro das vesículas, formado no aparelho de Golgi e, em sequência, é secretado para a matriz extracelular (Figura 4). Na matriz extracelular, ocorre a ação das C- e N-peptidases, para clivar as duas estruturas globulares ligadas às extremidades do procolágeno. A ação dessas enzimas é necessária para iniciar o processo de fibrilogênese (produção de colágeno), pois essas estruturas globulares ligadas ao procolágeno ocupam um grande espaço em volta da molécula. Assim, é necessário que ocorra o processo de clivagem para formação do tropocolágeno (Figura 4), que começa a se unir com outras moléculas de tropocolágeno, formando as fibrilas (NEKLYUDOV, 2003).

As moléculas de tropocolágeno unem-se na forma de conformação torsa por meio de associações lado a lado, estabilizadas primeiramente pelas interações hidrofóbicas e eletrostáticas. As ligações peptídicas estão presentes nas formações das ligações cruzadas covalentes intermoleculares entre as cadeias, resultado da interação entre os grupos aldeídos e grupos aminos livres. Essas ligações cruzadas fornecem a estabilidade e a força tensora necessária à estrutura supramolecular (Figura 4). Existem quatro resíduos-chave envolvidos no início das ligações das cadeias do tropocolágeno: dois resíduos de lisina ou hidroxilisina de peptídeos, contendo o N-terminal; e dois resíduos de lisina ou hidroxilisina de peptídeos, contendo o C-terminal. O arranjo cabeça-cauda-torso das moléculas de tropocolágeno permite a interação entre os peptídeos contendo o N-terminal com os peptídeos adjacentes contendo o C-terminal. O percurso helicoidal dessa superestrutura é destrógiro, sentido oposto ao

enrolamento das hélices polipeptídicas individuais, que é levógira. Essas duas conformações permitem um enrolamento apertado possível das múltiplas cadeias polipeptídicas. As fibrilas de colágeno são compostas de agregados de moléculas de colágeno ao longo de um eixo paralelo, mas cujas extremidades são igualmente sobrepostas para produzir bandas de 70 nm. O conjunto de fibrilas forma as fibras de colágeno, que se organizam em feixes (Figura 4) (SILVA e PENNA, 2012; NELSON e COX, 2014; DAMODARAN *et al.*, 2010).

Figura 4— Processo de formação, organização e estrutura de colágeno.



Fonte: SILVA e PENNA, 2012; DAMODARAN *et al.*, 2010.

Destaca-se o colágeno tipo I (COL I) identificado como o principal colágeno fibrilar em quase todos os tecidos conjuntivos vertebrais. Ele é único, pois para a molécula de colágeno do tipo I, duas cadeias são idênticas, denominadas $\alpha 1$, e uma é homóloga, mas quimicamente distinta, denominada $\alpha 2$ (ZANABONI *et al.*, 2000).

3.2.2. Métodos de obtenção do colágeno

Três métodos de extração de colágeno são reportados: isolamento ácido, isolamento enzimático e precipitação salina, sendo os dois primeiros os mais utilizados.

Método de Isolamento Ácido

Baseado no uso de um ácido orgânico, geralmente ácido acético (CH_3COOH), 0,5 mol/L, pH= 2,5-3,0 por 48-96 horas a 4°C. O produto obtido é chamado de colágeno ácido solúvel (ASC, em inglês).

Método de Isolamento Enzimático

Baseado no uso de um ácido orgânico, geralmente ácido acético (CH_3COOH), 0,5 mol/L na presença de proteases, via de regra pepsina, em concentrações de 0,05 g por 100 g de matéria-prima, pH = 2,5-3,0 por 48-96 horas a 4°C. O produto obtido é chamado de colágeno pepsina solúvel (PSC, em inglês).

Método de Precipitação Salina

Baseado na utilização de um sal neutro e ácido acético (CH_3COOH), 0,05 mol/L, pH = 8,7-9,1 por 48-96 horas a 4°C (ABEROUMAND, 2012).

3.2.3. Aplicações do colágeno

Na literatura são reportadas diversas aplicações do colágeno. Silva e Penna (2012) relatam o uso do colágeno como ingrediente funcional em alimentos devido as suas propriedades emulsificantes, agentes espumantes, estabilizantes coloidais, formadores de películas biodegradáveis, agentes microencapsulantes, com a tendência de substituir o material sintético pelo natural.

Porém, o uso do colágeno está se expandindo rapidamente na área biomédica e no campo farmacêutico. Lee *et al.* (2001) relatam que em engenharia de tecidos, o colágeno está sendo utilizado para o desenvolvimento de suportes, seja isoladamente ou em combinação com outros materiais para substituição de pele, ou como vaso sanguíneo artificial, como válvula cardíaca, como enxertos ósseos, na substituição de cartilagem e ligamentos, etc. Relatam também que a utilização de colágeno em aplicações farmacêuticas inclui a produção de curativos para feridas, implantes vítreos e como transportadores para a liberação de fármacos.

3.2.4. Fontes de colágeno tipo I

Usualmente, colágenos tipo I (Col I) para aplicações biomédicas são principalmente obtidos a partir de cauda de rato (O'LEARY e WOOD, 2003) ou a partir de espécies bovina (HSU e CHUEH, 1999), suína (HUANG *et al.*, 2005) ou equina (ANGELE *et al.*, 2004). Colágenos a partir de diferentes espécies apresentam também alterações nas suas propriedades químicas, físicas e biológicas (ANGELE *et al.*, 2004). Segundo Techatanawata *et al.* (2011) tendões de rabos de ratos foram uma das primeiras fontes de colágeno tipo I a serem usadas para aplicações biomédicas. Colágeno tipo I extraídos de tendões calcâneos, popularmente conhecidos como tendões de Aquiles, de origem bovina são amplamente utilizados em aplicações dentárias, especialmente em implantodontia. No entanto, os surtos de encefalopatia espongiiforme bovina (EEB), vulgarmente conhecida como doença da “vaca louca”, e de febre aftosa resultaram na ansiedade entre os usuários de colágeno bovino, devido a não totalmente confirmada hipótese, de que o agente infeccioso pode ser transferido a partir de animais para seres humanos. Adicionalmente, o colágeno obtido a partir de ossos de porco não pode ser usado como um componente de alguns alimentos, por razões religiosas (HELCKE, 2000; SADOWSKA *et al.*, 2003).

Neste contexto existe surge uma oportunidade de fontes alternativas de colágeno. Senaratne *et al.* (2006) relatam que braços de polvos, peles de rã-touro, peles de lula e resíduos do processamento de peixes de água doce e peixes marinhos, incluindo peles, ossos e escamas, têm sido estudados com esse objetivo.

Na literatura muitos trabalhos são reportados utilizando as mais diversas espécies de peixes como matérias-primas para a extração de colágeno, tais como: tilápia (ZENG *et al.* 2009;), badejo do Alasca (YAN *et al.*, 2008), baiacu (HUANG *et al.*, 2011), bagre listrado

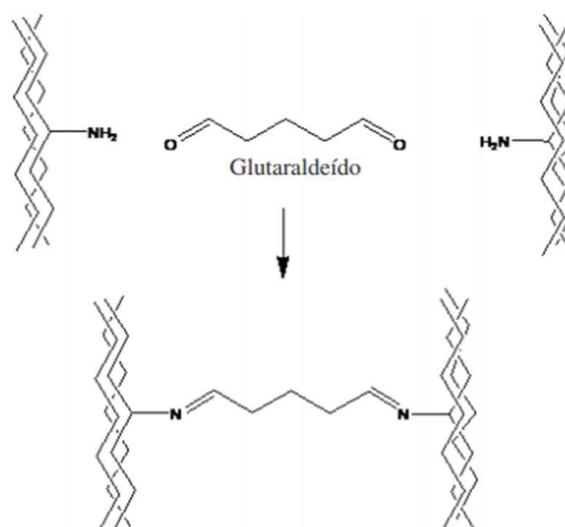
(SINGH *et al.*, 2011), *Sebastes mentella*, uma espécie de peixe vermelho (WANG *et al.*, 2008), cavala (LI *et al.*, 2013), *Lagocephalus gloveri*, uma espécie de peixe-sapo, (SENARATNE *et al.*, 2006), bacalhau do Báltico (SADOWSKA *et al.*, 2003), entre outros.

3.2.5. Uso de agente reticulante

Durante a extração do colágeno, as ligações covalentes entre as cadeias laterais (ligações cruzadas) são rompidas levando a uma maior taxa de degradação *in vivo* e uma diminuição das propriedades mecânicas. Visando reestabelecer essas ligações são usados agentes reticulantes, uma vez que a melhoria da taxa de biodegradação é indispensável para a realização de suas aplicações clínicas em materiais nanocompósitos (KIKUCHI *et al.*, 2004).

Reticulantes são moléculas de peso molecular muito menor que o peso molecular da cadeia principal entre duas ligações cruzadas consecutivas e normalmente apresentam, no mínimo, dois grupos funcionais reativos que permitam a formação de ponte entre cadeias poliméricas. O glutaraldeído (GA), de fórmula química $C_5H_8O_2$, é um agente reticulante normalmente usado na formação de redes de polipeptídios e proteínas devido à reatividade dos grupos aldeídos, que prontamente formam bases de Schiff com os grupos amino das proteínas (Figura 5) (COSTA JÚNIOR e MANSUR, 2008).

Figura 5 - Representação esquemática do tratamento do colágeno com o glutaraldeído.

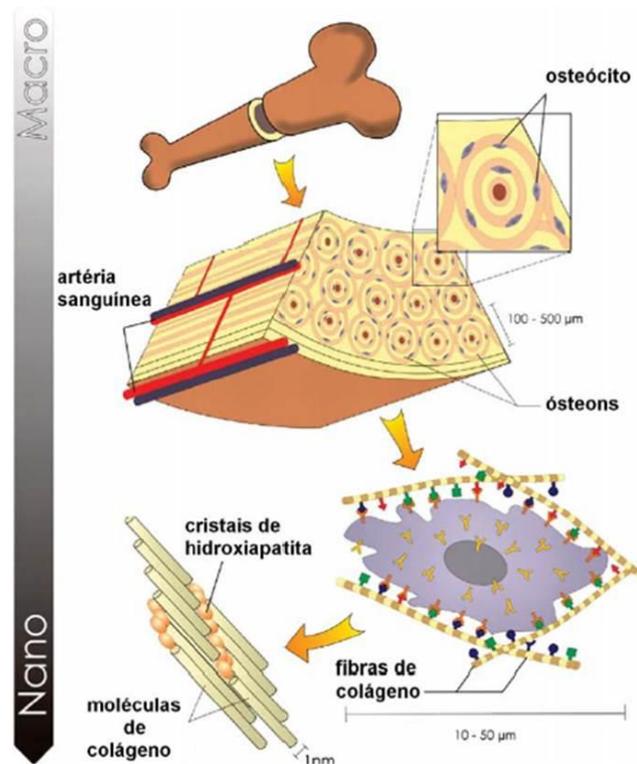


Fonte: BARGE, 2007.

3.3. Fosfatos de cálcio

Os ossos e dentes de todos os vertebrados são compósitos naturais formados por moléculas de colágeno ligadas em cadeias lineares arranjadas em fibras. Entre estas moléculas há pequenos compartimentos intersticiais regularmente espaçados, onde estão presentes nanocristais de um sólido inorgânico, que representa 65% da massa total do osso (Figura 6) (GUSTALDI e APARECIDA, 2010).

Figura 6- Estrutura e composição óssea em ressaltando as diferentes escalas de tamanho.



Fonte: CUNHA, 2010.

Os fosfatos de cálcio apresentam-se hoje como os principais compostos estudados e empregados como biomateriais para a reposição e regeneração do tecido ósseo, pois apresentam como principais características: semelhança com a fase mineral de ossos, dentes e tecidos calcificados; excelente biocompatibilidade; bioatividade; ausência de toxicidade local ou sistêmica; ausência de resposta a corpo estranho ou inflamações; aparente habilidade em se ligar ao tecido hospedeiro; taxas de degradação variáveis; osteocondutividade, ou seja, indicam o caminho para o crescimento ósseo, fazendo que ocorra sobre a superfície ou através dos poros. Dentre as cerâmicas de fosfato de cálcio, a hidroxiapatita (HA) se apresenta como material de referência na área de biomateriais. A Tabela 1 mostra os diversos tipos de fosfatos

de cálcio de interesse biológico existentes e suas principais características. (GOMES *et al.*, 2012; ARAÚJO *et al.*, 2007; KAWACHI *et al.*, 2000).

Tabela 1– Propriedades dos fosfatos de cálcio biologicamente relevantes.

Nome do composto	Sigla	Fórmula química	Razão Ca/P	Solubilidade a 25°C, (pKps)	Solubilidade a 37°C, (pKps)	pH de estabilidade em solução aquosa a 25°C
Monohidrogeno fosfato de cálcio dihidratado	DCPD	$\text{CaHPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	1,0	6,59	6,63	2,0-6,0
Fosfato de octacálcio	OCP	$\text{Ca}_8\text{H}_2(\text{PO}_4)_6 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	1,33	96,6	95,9	5,5-7,0
Fosfato de cálcio amorfo	ACP	$\text{Ca}_x(\text{PO}_4)_y \cdot n\text{H}_2\text{O}$	1,22 – 2,2	[a]	[a]	[a]
α -Fosfato tricálcico	α -TCP	$\alpha\text{-Ca}_3(\text{PO}_4)_2$	1,5	25,5	25,5	[b]
β -Fosfato tricálcico	β -TCP	$\beta\text{-Ca}_3(\text{PO}_4)_2$	1,5	28,9	29,5	[b]
Hidroxiapatita deficiente em cálcio	CDHA	$\text{Ca}_{10-x}(\text{HPO}_4)_x(\text{PO}_4)_{6-x}(\text{OH})_{2-x}$, ($0 < x < 1$)	1,5 – 1,66	$\approx 81,5$	$\approx 81,5$	6,5-9,5
Hidroxiapatita	HA	$\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$	1,67	116,8	117,2	9,5-12

[a] Não pode ser mensurado com precisão.

[b] Esses compostos não podem ser precipitados a partir de uma solução aquosa.

Fonte: adaptado de DOROZHKIN, 2002.

Uma das propriedades mais importantes dos fosfatos de cálcio, a qual é explorada nas diversas aplicações e que pode prever seu comportamento *in vivo*, é a solubilidade em água. De forma geral, quanto maior a razão Ca/P, menor será a solubilidade. Fosfatos de cálcio com diferentes morfologias e estequiometrias podem ser preparados variando os parâmetros de síntese como: temperatura de precipitação, pH do meio, tempo reacional, velocidade de adição de reagentes, temperatura do tratamento térmico (GOMES, 2012; RODRIGUEZ-LORENZO e VALLET-REGÍ, 2000).

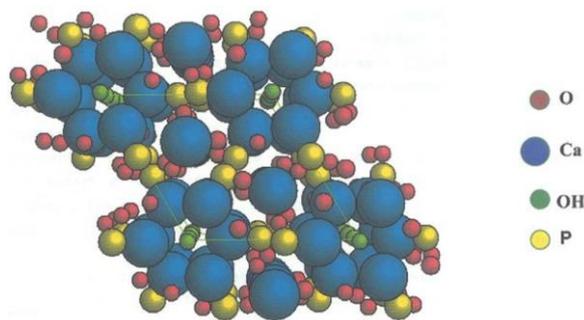
3.3.1. Hidroxiapatita (HA)

Sabe-se que a hidroxiapatita (HA) é um fosfato de cálcio hidratado de fórmula química, quando estequiométrica, $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ e corresponde ao principal componente mineral dos ossos e dentes sendo, portanto, sua biocompatibilidade, bioatividade e osteocondutividade amplamente difundida, o que favorece a proliferação de fibroblastos,

osteoblastos e outras células ósseas, as quais não a distinguem da superfície óssea, dada sua grande similaridade química superficial. A superfície da HA permite interações do tipo dipolo-dipolo com moléculas de água e proteínas, como o colágeno, causando a adsorção destas e conseqüente regeneração tecidual. A bioatividade da HA está relacionada à sua capacidade de realizar a ligação direta com o tecido ósseo, sem interposição de tecido fibroso (DUARTE, 2014; GUSTALDI e APARECIDA, 2010; ZANIN *et al.*, 2007; PEREIRA *et al.*; 2012; SANTOS, 2012).

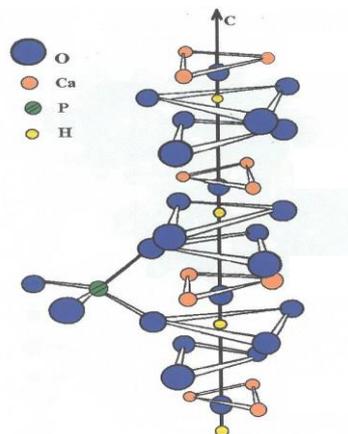
A estrutura da hidroxiapatita pertence ao sistema hexagonal com dimensões de célula cristalina de $a = b = 0,9423 \text{ nm}$ e $c = 0,6875 \text{ nm}$ (Figura 7), pertencendo ao grupo espacial $P6_3/m$, caracterizado por um eixo C de 6 unidades perpendiculares a 3 eixos equivalentes mantendo um triângulo de 120° (Figura 8) (CUNHA, 2010).

Figura 7 – Representação esquemática da estrutura cristalina da HA estequiométrica.



Fonte: GUSTALDI e APARECIDA, 2010.

Figura 8– Representação esquemática da estrutura cristalina da HA estequiométrica ao longo do eixo c.



Fonte: MAVROPOULOS, 1999.

Esses valores das dimensões de célula unitária são reportados para a HA mineral ou HA pura preparada por reação em estado sólido ou precipitação e sinterização a 1100°C. A célula unitária de HA tem seis grupos PO_4^{3-} , cinco grupos Ca^{2+} e dois grupos OH^- (CUNHA, 2010).

A estrutura da HA permite substituições catiônicas e aniônicas isomorfas com grande facilidade: o Ca^{2+} pode ser substituído por metais tais como o Mg^{2+} , Pb^{2+} , Cd^{2+} , Cu^{2+} , Zn^{2+} , Sr^{2+} , Co^{2+} , Fe^{2+} , etc; os grupos PO_4^{2-} podem ser substituídos por carbonatos (CO_3^{2-}) e vanadatos (VO_4^{3-}) e, os grupos OH^- por carbonatos, flúor (F^-) e cloro (Cl^-). Estas substituições podem alterar a cristalinidade, os parâmetros de rede, as dimensões dos cristais, a estabilidade, a bioatividade, a biocompatibilidade, a solubilidade e as propriedades de adsorção da estrutura da hidroxiapatita sem que ocorra significativa mudança na simetria hexagonal da estrutura (SANTOS, 2002).

Entretanto, a hidroxiapatita biológica não é estequiométrica, sendo observada uma deficiência em cálcio, como também traços de carbonatos (CO_3^{2-}), tornando-a biologicamente mais reativa. O balanço eletrônico das cargas pode ser obtido pela ausência de grupos hidroxilas (OH^-) ou, alternativamente, pela presença do ânion hidrogenofosfato (HPO_4^{2-}) no lugar do PO_4^{3-} . A hidroxiapatita deficiente em cálcio (CDHA) é geralmente caracterizada pela razão Ca/P. Enquanto a razão molar Ca/P da HA estequiométrica é igual a 1,67, a razão molar da CDHA pode variar de 1,5 a 1,67. Devido a essa deficiência de cálcio, fatores como a influência do colágeno e outras moléculas orgânicas, o mineral presente no tecido ósseo não é uma estrutura perfeitamente estequiométrica da hidroxiapatita de cálcio, mas uma estrutura complexa, com fórmula química genérica $\text{Ca}_{10-x}(\text{HPO}_4)_x(\text{PO}_4)_{6-x}(\text{OH})_{2-x}$, onde $0 < x < 1$ (VAZ, 2007; GOUVEIA, 2008).

Suas características químicas e estruturais possibilitam seu uso na área médica como material biocompatível em implantes e próteses (COSTA *et al.*, 2009). Na ortopedia existe um particular interesse em usá-la como revestimento de próteses metálicas para promover a ligação interfacial estável entre o material implantado e o tecido vivo. No tratamento de tumores, esse biomaterial vem sendo usado como suporte de ação prolongada. A introdução de drogas anticancerígenas em blocos de hidroxiapatita porosa permite que o tratamento da doença seja realizado com a liberação gradual da droga no organismo (FULMER *et al.*, 1992). Na área odontológica a hidroxiapatita é utilizada em casos de doenças periodontais, preenchimento de cavidades císticas ou mesmo aumentos de rebordo alveolar, implantes

dentários, além de outras aplicações para correções buco-maxilofaciais, onde a hidroxiapatita é utilizada para evitar perda óssea após extração de um ou vários elementos dentários, como também, recuperação de áreas com reabsorção óssea (LEGEROS, 1988).

Nas áreas de medicina e odontologia a HA tem sido utilizada na forma particulada e um dos grandes problemas de sua utilização nesta forma é sua dispersão para zona de tecidos moles causando problemas, incluindo a perda de partículas (RIGO *et al.*, 2007; E´GUES, 2005). Muitos autores aconselham a utilização da hidroxiapatita particulada em conjunto com uma série de materiais, tais como: elastina (TEJEDA-MONTESA *et al.*, 2014), quitosana (HEIDARIA *et al.*, 2015), colágeno (BEGAM e SASMAL, 2014), entre outros, facilitando o manuseio e a adaptação adequada do material na medida em que diminui o desalojamento das partículas. Vários autores sugerem o colágeno para este fim, pois este material constitui-se em um grande agente de união, biocompatível e reabsorvível, responsável pela preservação da migração das partículas cerâmicas, até a incorporação pelo tecido do paciente (COSTA, 2009).

3.3.2. Métodos de obtenção de HA

Dois tipos de hidroxiapatitas devem ser considerados: as sintetizadas em altas temperaturas e que apresentam boa cristalinidade e tamanho de cristais grandes (Via Seca), e as hidroxiapatitas sintetizadas em baixas temperaturas que apresentam baixa cristalinidade e tamanho de cristais pequenos (Via Úmida) (FULMER *et al.*, 1992).

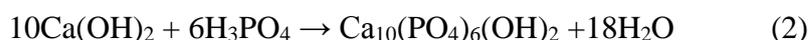
Método Via Seca

O produto obtido apresenta alta cristalinidade, obtido por volta de 900°C seguindo a seguinte reação:



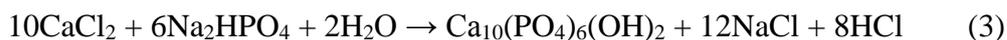
Métodos Via Úmida

a) Reação ácido-base



b) Reação entre sais de fosfato

O produto obtido apresenta partículas pequenas (<10 µm) e baixa cristalinidade, similar aos tecidos naturais.



Método Hidrotermal

Método idêntico à via úmida, sob alta pressão e temperatura. O produto obtido apresenta partículas nanométricas ou milimétricas, sendo possível a obtenção de materiais com porosidade similar à hidroxiapatita obtida de corais. A partir dos diferentes pós, podem-se obter diferentes morfologias e formatos de materiais, sejam densos ou extremamente porosos, os quais incluem técnicas de processamentos cerâmicos tradicionais e avançadas como: prensagem, *gel casting*, injeção, sol-gel etc. (COSTA *et al.*, 2009).

O grau da não estequiometria da hidroxiapatita depende do controle das condições durante a síntese. A precipitação rápida durante a titulação da solução de cálcio em solução de fosfato pode levar a falta de homogeneidade química no produto final ou, ainda, uma diminuição do pH da solução abaixo de 9 pode conduzir à formação da estrutura da HA deficiente em íons de cálcio (CDHA). Uma variedade de métodos tem sido proposta para sintetizar a CDHA. Um dos mais utilizados é o de precipitação ou hidrólise por via úmida com temperatura variando de 25 a 100°C e pH abaixo de 9 (COSTA *et al.*, 2009; CALIMAN, 2011).

3.4. Materiais nanocompósitos

Os nanocompósitos são compósitos em que pelo menos uma das fases mostra dimensões nanométricas (menor ou igual a 100 nm). Materiais nanocompósitos surgiram como alternativas adequadas para ultrapassar as limitações dos compósitos em escala micro e dos monolíticos, enquanto que representam desafios de preparação relacionados com o controle da composição elementar e da estequiometria dos nanocristais. Eles tornaram-se bem conhecidos devido às suas propriedades únicas e amplo potencial de aplicação em diferentes áreas. Os polímeros são bastante utilizados, principalmente como suportes, enquanto nanopartículas inorgânicas atuam como agentes de reforço durante a síntese de alguns tipos de nanocompósitos. O objetivo principal de se produzir um nanocompósito é a obtenção de um sistema com propriedades superiores às dos componentes unitários. Algumas limitações associadas aos polímeros, por exemplo, podem ser superadas pelo emprego de seus

compósitos, dependendo da aplicação (CAMARGO *et al.*, 2009; HANEMANN e SZABO, 2010; UI-ISLAM *et al.*, 2014).

3.4.1. Compósitos de colágeno e nanohidroxiapatita

Na literatura são reportados muitos trabalhos de compósitos de colágeno/hidroxiapatita, porém, estudos de desenvolvimento de compósitos utilizando colágeno/nanohidroxiapatita são encontrados em menor número. Basicamente, os trabalhos apenas divergem quanto à técnica empregada para a modificação superficial do colágeno, necessária para estimular a formação de apatita na sua superfície. A biomineralização é um processo natural para a formação de ossos e dentes em seres humanos e animais. O chamado método biomimético para recobrimento de materiais com fosfato de cálcio é inspirado por esse processo e consiste na formação de uma camada biologicamente ativa de apatita sobre uma superfície através da imersão desta em uma solução artificial supersaturada de cálcio e fosfato (DUARTE, 2014; LIU *et al.*, 2002).

Jia *et al.*, (2013) desenvolveram suportes de colágeno comercial e nanohidroxiapatita para o crescimento de condrócitos na reparação de tecidos de cartilagem. Lian *et al.*, (2013) desenvolveram um substituto ósseo a base de colágeno de cauda de rato, nanohidroxiapatita e ácido lático, carregado do antibiótico vancomicina, para a avaliação das propriedades antibacteriana e de biocompatibilidade do compósito. Libonati *et al.* (2014) realizaram um estudo das propriedades mecânicas de compósitos de colágeno e nanohidroxiapatita em simulações para avaliar a interface do nanocompósito e do osso, por meio de um modelo.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. Matéria-prima e reagentes.

As amostras de peles foram obtidas em uma empresa de beneficiamento de pescado, situada em Fortaleza, Ceará.

Todos os reagentes foram utilizados sem nenhuma purificação adicional e como recebidos do fornecedor.

4.2. Metodologia

4.2.1. Caracterização das peles de tilápia

As análises foram realizadas no laboratório de Tecnologia da Biomassa, situado na Embrapa Agroindústria Tropical, em Fortaleza, CE.

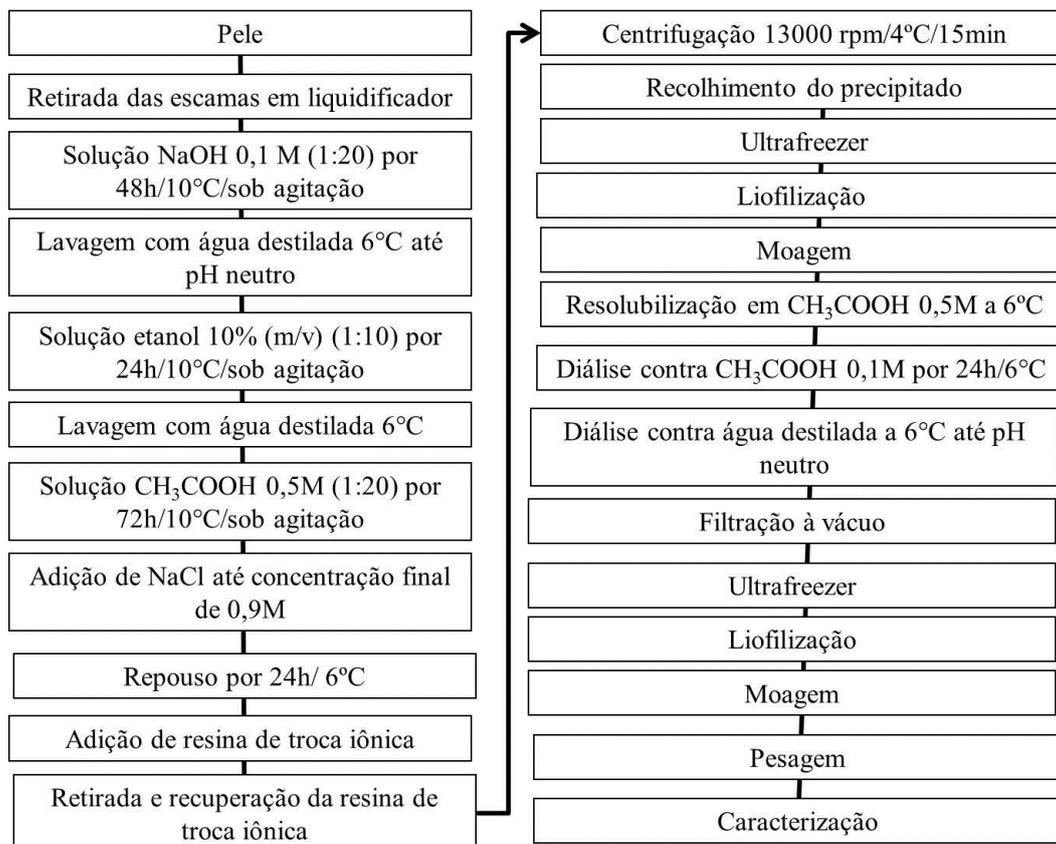
O teor de umidade foi determinado em balança de infravermelho modelo MARTE ID50. Teores de cinzas foram determinados por método gravimétrico, de lipídeos foram determinados segundo o método de extração de Soxhlet e de proteínas foram inferidos pelo método de Kjeldahl de determinação de nitrogênio, com fator de conversão de 6,25 (AOAC, 1995).

4.2.2. Extração do colágeno proveniente da pele de Tilápia do Nilo (*Oreochromis Niloticus*)

A metodologia adotada foi proposta por Zeng *et al.* (2009), com modificações utilizando os métodos de via ácida e precipitação salina. Inicialmente, as peles foram liquidificadas para que as escamas fossem removidas. Em seguida, as amostras foram postas em solução de hidróxido de sódio (NaOH) 0,1 Mol.L⁻¹, na proporção 1:20, por 48 horas, a 10°C, sob agitação, para que houvesse a retirada das proteínas não colagenosas. Após essa etapa, houve o descarte do sobrenadante, e as amostras foram lavadas com água destilada a 6°C até que o pH neutro fosse alcançado. Posteriormente, as amostras foram imersas em solução de etanol (CH₃CH₂OH) 10% (v/v), na proporção 1:10, por 24 horas, a 10°C, sob agitação para que houvesse a retirada de gorduras presentes na amostra. Novamente, foi descartado o sobrenadante após as 24 horas e o precipitado foi lavado com água destilada a 6°C para retirar o excesso de etanol. Após essa etapa, as amostras foram imersas em solução de ácido acético (CH₃COOH) 0,5 Mol.L⁻¹, na proporção 1:20 durante 72 horas, sob agitação, a 10°C. Em seguida, adicionou-se solução de cloreto de sódio (NaCl) até uma concentração

final de $0,9 \text{ mol.L}^{-1}$ e deixou-se em repouso por 24 horas, a 6°C , para que houvesse a precipitação do colágeno. Posteriormente, adicionou-se resina de troca iônica a fim de diminuir o teor de matéria inorgânica do material. Após a retirada e recuperação da resina, foi realizada uma centrifugação a 13000 rpm, a 4°C , durante 15 minutos para que o colágeno precipitado fosse recolhido. Em seguida, o colágeno obtido foi levado ao ultrafreezer e, posteriormente, foi liofilizado e moído. Posteriormente, o colágeno liofilizado foi resolubilizado em $\text{CH}_3\text{COOH } 0,5 \text{ Mol.L}^{-1}$ a 6°C e foram realizadas duas etapas de diálise. A primeira etapa procedeu-se contra $\text{CH}_3\text{COOH } 0,1 \text{ Mol.L}^{-1}$, durante 24 horas, a 6°C , a fim de diminuir a concentração do ácido na amostra. Uma segunda etapa de diálise foi realizada contra água destilada a 6°C até pH neutro, onde houve a troca de água a cada 24 horas. Após essa etapa, o material passou por uma filtração à vácuo, em seguida foi levado ao ultrafreezer para que, posteriormente fosse liofilizado. Após a liofilização, o material foi moído em moinho analítico e, posteriormente, pesado para que fossem feitas as caracterizações, como descrito no fluxograma da Figura 9.

Figura 9- Fluxograma de extração do colágeno.



Fonte: Elaborada pela autora.

4.2.2. Caracterização da pele de tilápia

As análises foram realizadas no laboratório de Tecnologia da Biomassa, situado na Embrapa Agroindústria Tropical, em Fortaleza, CE.

O teor de umidade foi determinado em balança de infravermelho modelo MARTE ID50. Teores de cinzas foram determinados por método gravimétrico, de lipídeos foram determinados segundo o método de extração de Soxhlet e de proteínas foram determinados pelo método de Kjeldahl (AOAC, 1995).

4.2.3. Caracterização do colágeno extraído de pele de Tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*)

O colágeno obtido foi caracterizado através das técnicas de Microscopia Eletrônica de Varredura, Espectroscopia de Infravermelho com Transformada de Fourier, Espectroscopia de Absorção UV-VIS, Potencial Zeta, Viscosimetria e Calorimetria Exploratória Diferencial.

4.2.3.1. Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

A análise de MEV foi realizada no laboratório de Microscopia, situado na Embrapa Agroindústria Tropical, em Fortaleza, CE.

Foi utilizada uma metalizadora Emitech, para o recobrimento com platina, formando uma camada com 60 nm de espessura, e Microscópio Eletrônico de Varredura Zeiss DSM 940A, sob uma voltagem de aceleração de 15 kV.

4.2.3.2. Espectroscopia na Região do Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR)

A análise de FTIR foi realizada no Laboratório Multiusuário de Química de Produtos Naturais, situado na Embrapa Agroindústria Tropical, em Fortaleza, CE.

Foi utilizado um espectrômetro Agilent, modelo Cary 660, na região de 4000 a 400 cm^{-1} , utilizando-se pastilhas de KBr. Os dados obtidos foram plotados através do software OriginPro 8.

4.2.3.3. Espectroscopia de Absorção UV-VIS

A análise de absorção UV-VIS foi realizada no laboratório de Tecnologia da Biomassa, situado na Embrapa Agroindústria Tropical, em Fortaleza, CE.

O colágeno foi dissolvido em solução de ácido acético 0,5 mol.L^{-1} até uma concentração final de 1mg/mL. Foi feito uma linha de base com solução de ácido acético 0,5

mol.L⁻¹. Foi utilizado um espectrofotômetro UV-VIS espectrofotômetro UV-2450 (SHIMADZU), no intervalo de comprimento de onda de 190 – 550 nm. Os dados obtidos foram plotados através do software OriginPro 8.

4.2.3.4. Potencial Zeta (ζ)

A análise de potencial zeta foi realizada no laboratório de Tecnologia da Biomassa, situado na Embrapa Agroindústria Tropical, em Fortaleza, CE.

O colágeno foi solubilizado em ácido acético 0,5 mol. L⁻¹ em uma concentração de 1 mg/ml. A solução foi agitada à temperatura de 4°C por 24 horas. Foi utilizado um analisador de tamanho de partícula com potencial zeta modelo Zetasizer Nano-ZS (Malvern Instruments, UK), operando na temperatura de 25°C. Utilizou-se ácido nítrico 1M e hidróxido de potássio 1M em uma faixa de pH de 2,39 a 12,0, com leituras a cada mudança de pH de 0,5. Os dados obtidos foram plotados através do software OriginPro 8.

4.2.3.5. Temperatura de Desnaturação por Viscosimetria

A análise de temperatura de desnaturação foi realizada no laboratório de Tecnologia da Biomassa, situado na Embrapa Agroindústria Tropical, em Fortaleza, CE.

O colágeno foi solubilizado em ácido acético 0,5 mol. L⁻¹ até uma concentração final de 0,37% (m/v). Foi utilizado um viscosímetro Brookfield Synchroelectic Viscometer modelo DV II+, acoplado a banho ultratermostático Solab SL 152. O experimento foi realizado em varredura de 10,7°C a 50,7°C, utilizando spindle S01, a uma velocidade 100 rpm, com taxa de aquecimento de 2°C/min. Os dados obtidos foram plotados através do software OriginPro 8.

4.2.3.6. Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC)

A análise de DSC foi realizada no laboratório de Tecnologia da Biomassa, situado na Embrapa Agroindústria Tropical, em Fortaleza, CE.

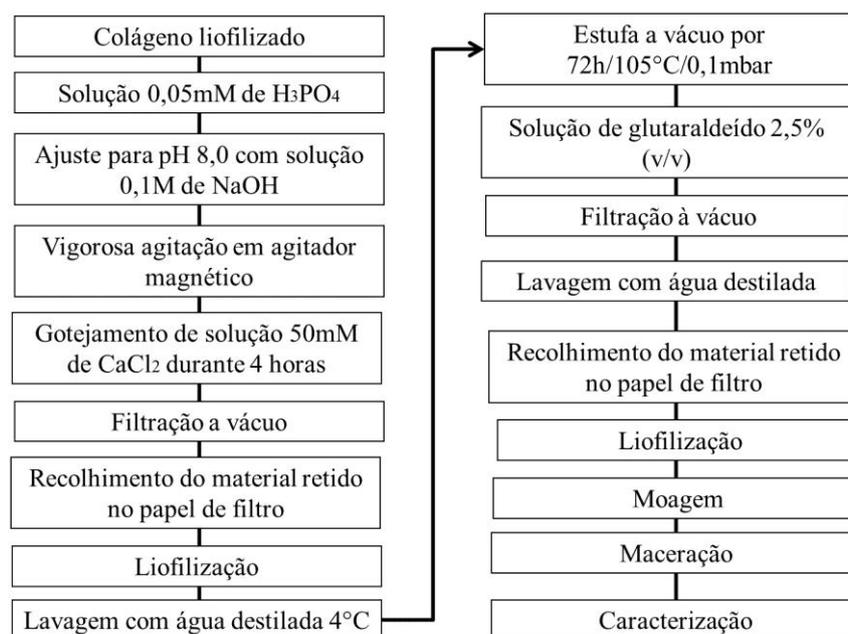
Foi utilizado um equipamento DSC Q20 V24.9 Build 121 e gás nitrogênio com vazão de 50 mL/min. O experimento foi realizado a uma taxa de 1°C/min com uma temperatura de equilíbrio de 10°C e uma temperatura final de 100°C, com massa de amostra inicial de 4,4 mg e utilizando panela de alumínio selada. Os dados obtidos foram plotados através do software OriginPro 8.

4.2.4. Produção do compósito de colágeno e nanohidroxiapatita.

A metodologia adotada foi adaptada de Liu (2008), com modificações, utilizando o método de precipitação por via úmida, como descrito no fluxograma da Figura 10. Todas as soluções utilizadas foram armazenadas sob refrigeração.

Inicialmente, 2,67g do colágeno previamente obtido foram adicionados a 100 mL de solução 50 mMol.L⁻¹ de ácido fosfórico (H₃PO₄) (pH = 2,7) e homogeneizado. Em seguida, houve um ajuste para pH 8,0 utilizando-se solução 0,1 Mol.L⁻¹ de hidróxido de sódio (NaOH). Posteriormente, foram adicionados 167 mL de solução 50 mMol.L⁻¹ de cloreto de cálcio (CaCl₂) através de gotejamento durante 4 horas sob vigorosa agitação utilizando um agitador magnético. Após esse tempo, foi realizada uma filtração a vácuo para que o material desejado ficasse retido no papel de filtro. Em seguida, o material foi liofilizado. Após a liofilização, a amostra passou por um tratamento em estufa a vácuo por 72h sob pressão de 0,1 mbar para que, posteriormente, fosse fixada em solução de glutaraldeído 2,5% (v/v). Em seguida, houve novamente uma filtração a vácuo e uma lavagem final com água destilada para que o excesso de glutaraldeído fosse retirado. Finalmente, o material foi liofilizado, moído em moinho analítico e macerado com auxílio de pistilo e almofariz para que fossem realizadas as caracterizações.

Figura 10- Fluxograma de elaboração do compósito de colágeno e nanohidroxiapatita.



Fonte: Elaborada pela autora.

4.2.5. Caracterização do compósito de colágeno e nanohidroxiapatita.

O colágeno obtido foi caracterizado através das técnicas de Espectroscopia de Infravermelho com Transformada de Fourier, Microscopia Eletrônica de Varredura, Espectroscopia de Energia Dispersiva, Microscopia Eletrônica de Transmissão e Difração de Raios-X.

4.2.5.1. Espectroscopia na Região do Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR)

A análise de FTIR foi realizada no Laboratório Multiusuário de Química de Produtos Naturais, situado na Embrapa Agroindústria Tropical, em Fortaleza, CE.

Foi utilizado um espectrômetro Agilent, modelo Cary 660, na região de 4000 a 400 cm^{-1} , utilizando-se pastilhas de KBr. Os dados obtidos foram plotados através do software OriginPro 8.

4.2.5.2. Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

A análise de MEV foi realizada no Laboratório de Polímeros do Departamento de Engenharia de Materiais, situado na Universidade Federal do Rio Grande do Norte, em Natal, RN.

Foi utilizada um Microscópio Eletrônico de Varredura modelo Hitachi Tabletop Microscope TM-3000, sob uma voltagem de aceleração de 5 kV e 15 kV.

4.2.5.3. Espectroscopia de Energia Dispersiva (EDS)

A análise de EDS foi realizada no Laboratório de Microscopia Eletrônica de Varredura, do Departamento de Geologia, situado na Universidade Federal do Ceará, em Fortaleza, CE.

Foi utilizado um EDS da marca Hitachi, modelo Swift ED3000 X-Stream.

4.2.5.4. Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET)

A análise de MET foi realizada no Núcleo de Plataformas Tecnológicas, situado no Centro de Pesquisa Aggeu Magalhães da Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ), em Recife, PE.

Foi utilizado um Microscópio Eletrônico de Transmissão (MET) da marca FEI Company, modelo Tecnai Spirit Biotwin G2, operando com uma tensão de 80 Kv. As imagens obtidas foram analisadas por meio do software Gimp 2.8.

4.2.5.5. Difração de Raios-X (DRX)

A análise de DRX foi realizada no Laboratório de Raios-X, do Departamento de Física, situado na Universidade Federal do Ceará, em Fortaleza, CE.

Foi utilizado um difratômetro da marca Xpert Pro modelo MPD operando a 40 kV e 50 mA. O instrumento foi equipado com um tubo de cobre (Cu), comprimento de onda 1,54 Å. As amostras foram examinadas com ângulo 2θ variando de 5° a 50° . Os dados obtidos foram plotados através do software OriginPro 8.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Caracterização das peles de tilápia quanto aos teores de umidade, cinzas, proteínas e lipídeos.

Os valores obtidos através da caracterização da pele antes da extração do colágeno podem ser observados na Tabela 1. Foi observado um teor de umidade de 70,51%, estando próximo ao teor esperado, pois, de acordo com Hoinacki (1989), o teor de água da pele varia entre 60 e 70 %. O percentual de gordura da pele de tilápia foi de 9,31%, sendo bastante elevado, portanto, é necessário que os tratamentos prévios à extração sejam eficientes na retirada do material lipídico. Sabe-se, que o odor peculiar das peles de pescado deve-se aos compostos nitrogenados e às gorduras que contêm grandes porcentagens de ácidos graxos não saturados (ALFARO e SILVA, 2010). O conteúdo de proteína em base úmida encontrado na pele de tilápia foi de 26,30% e representara a quantidade máxima de colágeno presente no tecido e, portanto, o máximo rendimento possível da extração (ALFARO e SILVA, 2010). O teor de cinzas observado foi de 0,44%, valor abaixo do encontrado por Franco *et al.* (2013), que obteve um teor de cinzas de 1,82% para a Tilápia do Nilo. Isso se deve ao fato de as escamas, ricas em cálcio (Ca) e fósforo (P) terem sido retiradas antes da realização da análise.

Tabela 2 - Composição da pele de tilápia, em base úmida, quanto aos teores de umidade, lipídeos, proteínas e cinzas.

Componentes (%)	Pele de tilápia
Umidade	70,51
Lipídeos	9,31
Proteínas	26,30
Cinzas	0,44

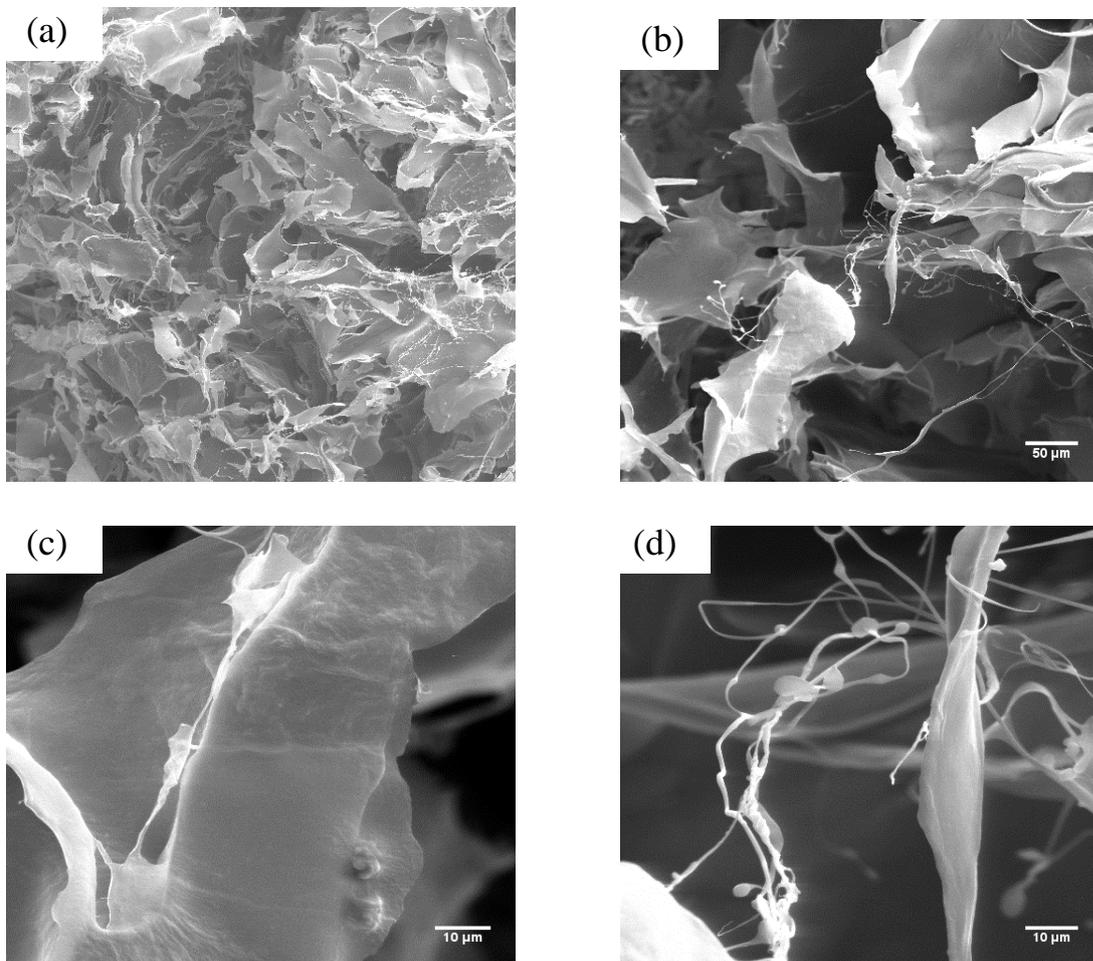
Fonte: Elaborada pelo autor.

5.2. Caracterização do colágeno extraído de pele de Tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*)

5.2.1. Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

As características morfológicas do colágeno foram estudadas através das imagens obtidas por Microscopia Eletrônica de Varredura (Figura 11).

Figura 11 – Imagens de MEV do colágeno obtido: (a) Aumento 50x; (b) Aumento 200x; (c) Aumento 1000x; (d) Aumento 1000x com destaque para as fibrilas.



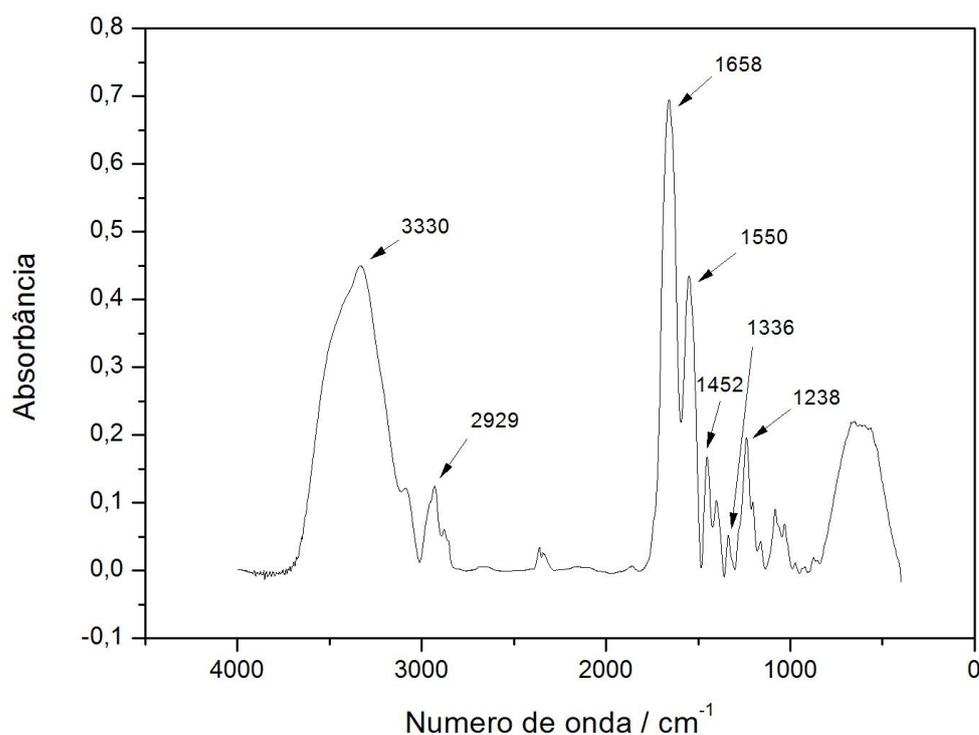
Fonte: Elaborada pela autora.

Podemos observar que o colágeno obtido apresentou superfície limpa, o que, segundo Wang *et al.* (2014), evidencia a remoção de proteínas não colagenosas e de materiais inorgânicos inicialmente presentes na amostra. Foi observado também que a amostra apresentou morfologia de superfície de folha regular com manta filamentosa e natureza fibrilar, típicos de colágeno tipo I, o que acarreta uma alta capacidade de absorção de água, de acordo com Tamilmozhi *et al.* (2013). Finalmente, foi observada uma superfície parcialmente enrugada que, de acordo com Schuetz *et al.* (2013), é possivelmente devido à desidratação decorrente do processo de liofilização.

5.2.2. Espectroscopia na Região do Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR)

A análise de FTIR foi realizada a fim de realizar uma caracterização estrutural dos principais grupos funcionais presentes na amostra. A Figura 12 mostra o espectro obtido após a análise de FTIR. Apenas as bandas mais relevantes foram analisadas e observa-se a presença de bandas características para a molécula de colágeno (Tabela 3).

Figura 12 - Espectro de FTIR para o colágeno de pele de tilápia.



Fonte: Elaborada pela autora.

Tabela 3 - Principais grupamentos observados no espectro de infravermelho.

Comprimento de onda (cm ⁻¹)	Atribuição	
3330	Estiramento de grupos N-H	Amida A
2929	Estiramento assimétrico de grupos CH ₂	Amida B
1658	Estiramento de grupos C=O	Amida I
1550	Deformação de grupos N-H acoplado com estiramento	Amida II

de grupos C-N		
1452	Deformação de grupos C-H	
1336	Estiramento de grupos C=O	
1238	Deformação angular de grupos N-H acoplado com estiramento de grupos C-N	Amida III

Fonte: Elaborada pela autora.

A banda relativa à Amida A foi encontrada em 3300 cm^{-1} . Esta banda é associada à vibração de estiramento de grupos N-H e mostra a existência de ligações de hidrogênio, provavelmente com um grupo carbonila da cadeia peptídica. A vibração de estiramento livre de grupos N-H ocorre na faixa de $3400\text{-}3440\text{ cm}^{-1}$. Porém, quando o grupo N-H de um peptídeo está envolvido em uma ligação de hidrogênio, a posição é deslocada para uma menor frequência, geralmente em 3300 cm^{-1} (VEERURAJ *et al.*, 2013). A posição da banda relativa à Amida B ocorreu em 2929 cm^{-1} , relacionada ao estiramento assimétrico de grupos CH_2 (YU *et al.*, 2014).

A banda relativa à Amida I, com frequências vibracionais características no intervalo de $1600\text{-}1700\text{ cm}^{-1}$, foi observada em 1658 cm^{-1} e está associada ao estiramento de grupos carbonílicos ao longo da estrutura polipeptídica e representa um marcador sensível da estrutura secundária da proteína. Essa observação confirma que a formação de ligação de hidrogênio entre estiramento de grupos N-H (posição X) e grupos C=O (Glicina) do quarto resíduo é responsável pela iniciação da tripla hélice (SINGH *et al.*, 2011). A banda relativa à Amida II, característica no intervalo de $1515\text{-}1570\text{ cm}^{-1}$, foi observada em 1550 cm^{-1} e está associada à deformação de grupos N-H acoplado com estiramento de grupos C-N (LIU *et al.*, 2014).

A banda observada em 1452 cm^{-1} está relacionada com deformação de grupos C-H presentes no anel pirrolidínico da prolina e da hidroxiprolina (VEERURAJ *et al.*, 2015). Uma banda de absorção em 1336 cm^{-1} foi observada relativa a estiramento de grupos C=O da carboxila ($-\text{COO}^-$), cujo intervalo vibracional é de $1345\text{-}1180\text{ cm}^{-1}$ (SOCRATES, 2001). Foi observada uma banda de absorção em 1238 cm^{-1} , correspondente à Amida III, que está

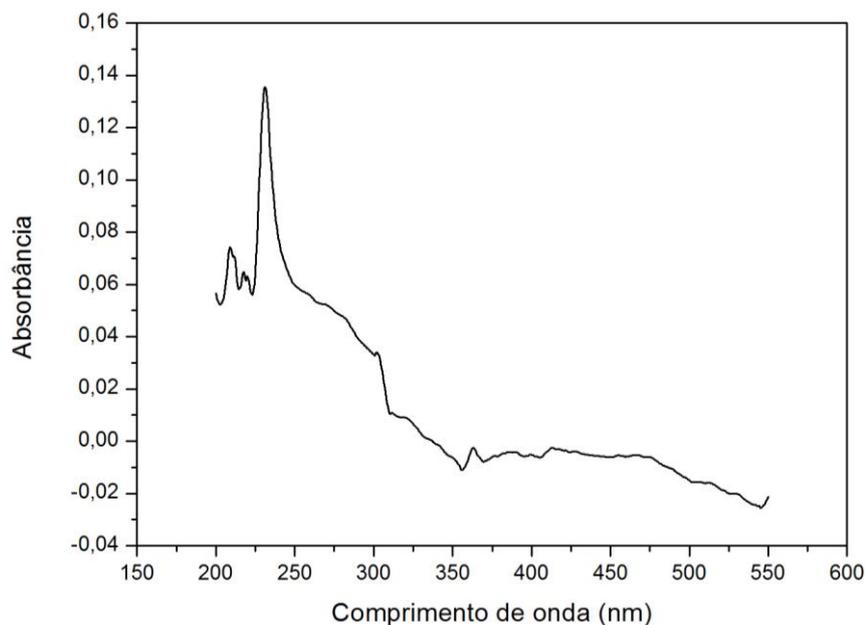
associada à deformação angular de grupos N-H acoplado com estiramento de grupos C-N (LI *et al.*, 2013).

O espectro vibracional mostrou ainda que a integridade da tripla hélice da estrutura colagênica se manteve através da razão das absorbâncias medidas em 1238 cm^{-1} e 1452 cm^{-1} . Para materiais formatados em solução ácida, a integridade da estrutura secundária do tropocolágeno pode ser verificada quando o valor da relação A_{1238}/A_{1452} for maior ou igual à unidade (AHMAD e BENJAKUL, 2010). Para o material preparado e utilizado neste trabalho, o valor encontrado para esta relação foi de 1,17, caracterizando que a integridade da tripla hélice foi mantida e não houve desnaturação da proteína.

5.2.3. Espectroscopia de Absorção UV-VIS

A análise de Espectroscopia de Absorção UV-VIS foi realizada a fim de se observar o máximo de absorbância da amostra. A Figura 13 mostra o espectro de absorção UV-VIS para o colágeno obtido.

Figura 13- Espectro de absorção UV-VIS do colágeno de pele de tilápia.



Fonte: Elaborada pela autora.

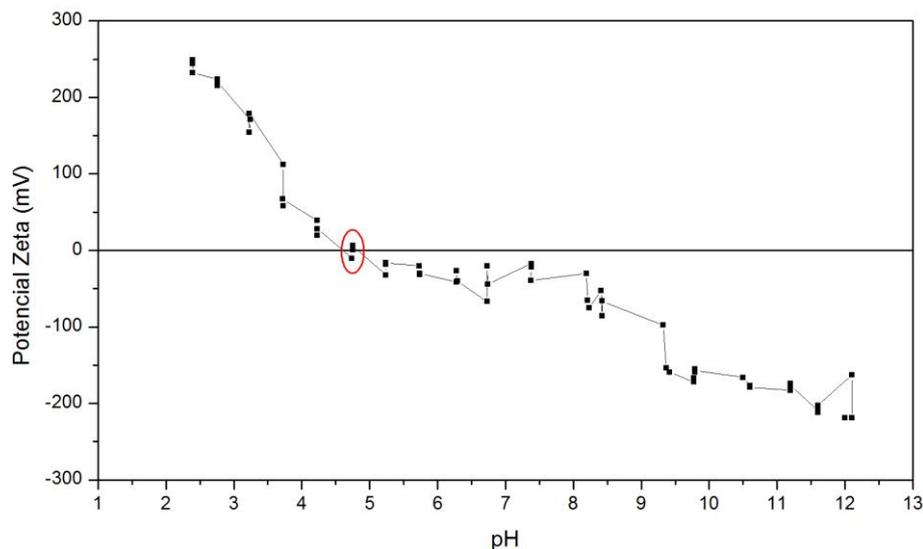
É possível observar uma banda de absorção intensa em 231,0 nm, característica do colágeno tipo I. Veeruraj *et al.* (2015) sugerem que grupos C=O, -COOH e -CONH₂ estavam acessíveis na cadeia polipeptídica da proteína. A maioria das proteínas tem um máximo de absorção ultravioleta em 280 nm devido à presença, em baixas quantidades, de aminoácidos

aromáticos que absorvem luz na região próxima do ultravioleta, como o triptofano, a fenilalanina e a tirosina (HUANG *et al.*, 2011). Kittiphattanabawon *et al.* (2010) indicaram que a ausência de pico de absorção do colágeno a 280 nm indica a pureza deste e a eficácia da remoção de proteínas não-colagenosas. Assim, isto indica uma eficácia no processo de isolamento do colágeno neste estudo.

5.2.4. Potencial Zeta (ζ)

O potencial Zeta mensura a presença de cargas superficiais na partícula, indicando o grau de repulsão entre as partículas igualmente carregadas e, conseqüentemente, a estabilidade da suspensão. A curva de potencial Zeta em função do pH da amostra de colágeno é mostrada na Figura 14.

Figura 14- Curva de variação do Potencial Zeta vs pH.



Fonte: Elaborada pela autora.

A medida de potencial zeta foi realizada por titulação potenciométrica que determinou a diferença de potencial gerada pela variação de cargas positivas e negativas das proteínas em função do pH do meio, sendo possível, através da técnica, determinar o ponto isoelétrico da proteína, ou seja, o pH em que as cargas negativas e positivas da proteína estão balanceadas e a proteína está eletricamente neutra. A partir do gráfico é possível observar que o ponto isoelétrico do colágeno se encontra no valor de pH igual a 4,72. O ponto isoelétrico foi observado em uma faixa ácida de pH, possivelmente devido a alta densidade de grupos carboxílicos. Foi constatado também que a carga molecular permaneceu muito baixa na região

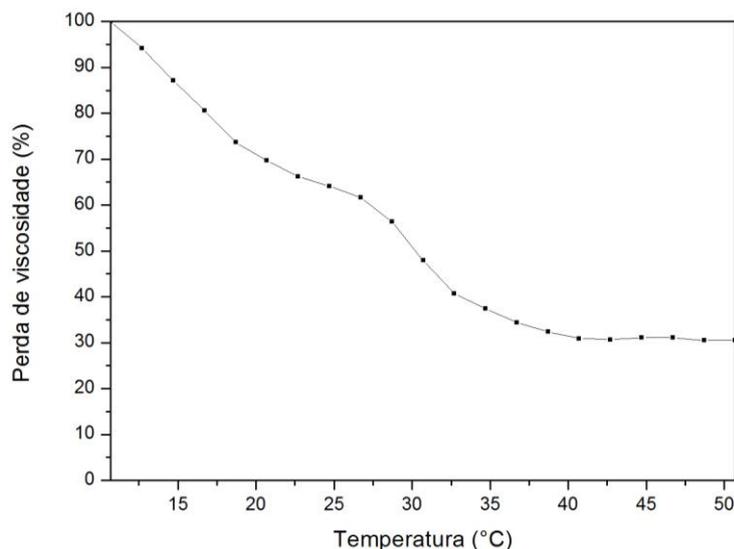
alcalina. Isso pode ser associado à baixa solubilidade do colágeno no intervalo alcalino, em que as formas de repulsão entre as moléculas com cargas negativas não foram suficientes para causar a solubilização completa (AHMAD e BENJAKUL, 2010; KAEWDANG *et al.*, 2014).

O pH em que o PI foi obtido foi o mesmo reportado por Singh *et al.* (2011) para colágeno extraído de pele de bagre listrado. Outros valores pHs para PIs são reportados na literatura como, por exemplo, pH=6,05 para atum amarelo (KAEWDANG *et al.*, 2014) e pH = 6,40 para o *Nemipterus hexodon*, um tipo de sargo (NALINANON *et al.*, 2011). Essas discrepâncias entre os PIs das espécies de peixes podem ser atribuídas pela pequena diferença nas suas composições de aminoácidos, principalmente nos domínios de superfície (AHMAD *et al.*, 2010).

5.2.5. Temperatura de Desnaturação

A análise de viscosimetria foi realizada a fim de se determinar a temperatura de início de desnaturação da proteína. A Figura 15 mostra a curva de perda de viscosidade em função da temperatura do colágeno.

Figura 15 – Gráfico de temperatura de início de desnaturação para o colágeno obtido pele de Tilápia do Nilo.



Fonte: Elaborada pela autora.

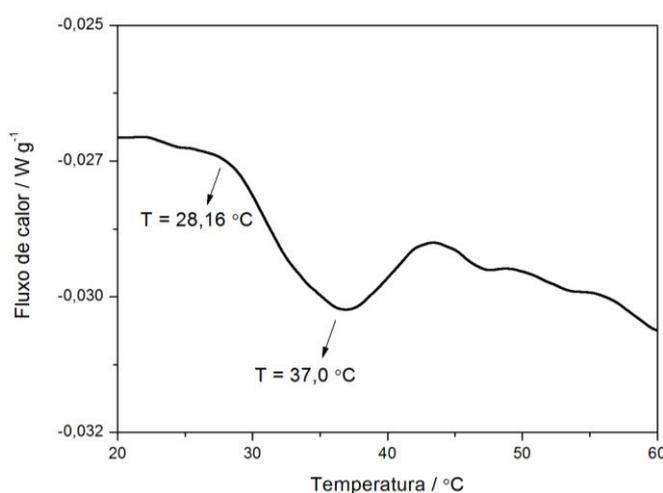
Perfis de desnaturação térmica do colágeno isolado fornecem pistas úteis para a estabilidade térmica deste em relação ao meio ambiente e ao teor de aminoácidos. A

temperatura de início de desnaturação foi calculada quando a taxa de viscosidade da amostra caiu para a metade do valor inicial. Isso foi observado a uma temperatura de 30,22°C. Esse resultado, é similar ao encontrado para colágeno extraído de diversas espécies de pescado como o *Lagocephalus gloveri*, 28°C (SENARATNE *et al.*, 2006), *Priacanthus tayenus*, 30°C (KITTIPIHATTANABAWON *et al.*, 2005) e *Diodon holocanthus*, 29,64°C (HUANG, *et al.*, 2011). A temperatura de desnaturação térmica do colágeno está relacionada com os teores de aminoácidos prolina e hidroxiprolina (VEERURAJ *et al.*, 2015). A viscosidade relativa é uma propriedade físico-química do colágeno e diminui continuamente com o aumento da temperatura. O aumento da temperatura quebra as ligações de hidrogênio entre as cadeias polipeptídicas adjacentes das moléculas do colágeno e, como resultado, a estrutura helicoidal se converte em uma estrutura espiral aleatória com uma viscosidade reduzida, afetando principalmente a estrutura secundária da proteína (JEEVITHAN *et al.*, 2014).

5.2.6. Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC)

A análise de Calorimetria Exploratória Diferencial foi realizada com o objetivo de confirmar o resultado da análise de viscosimetria e observar os eventos térmicos que envolvem a etapa de desnaturação da proteína. A Figura 16 mostra a curva obtida através da análise de Calorimetria Exploratória Diferencial.

Figura 16 – Gráfico de variação de fluxo de calor em função da temperatura para o colágeno.



Fonte: Elaborada pela autora.

Podemos observar a presença de um evento endotérmico iniciado 28,16°C, tendo seu ápice em 37,0°C. Esse valor foi próximo ao encontrado para a temperatura de início da

desnaturação da proteína pela análise viscosimétrica. Pesquisas indicam que o aumento da temperatura acarreta na desintegração da estrutura helicoidal do colágeno em bobinas aleatórias. Isso é possível através da modificação de propriedades físicas, tais como, viscosidade, difusão, dispersão de luz e atividade óptica. Assim, análises de DSC e de viscosidade são geralmente utilizadas para determinar a estabilidade térmica do colágeno (ZENG *et al.*, 2009). O valor encontrado foi próximo ao de Zeng *et al.* (2012) para colágeno de pele de cobia, onde foi observada temperatura máxima em sua curva de transição de 38,17 °C. Huang *et al.* (2011) obtiveram colágeno de pele de baiacu e observaram curvas de transição com temperaturas máximas em 29,64 °C. Zhang *et al.* (2009) obtiveram colágeno de pele bagre e observou eventos endotérmicos em 32,1 °C. Zeng *et al.* (2009) obtiveram colágeno de pele de tilápia pelo método ácido e observaram um evento endotérmico em 32,0 °C.

5.3. Caracterização do compósito de colágeno/nanohidroxiapatita

5.3.1. Espectroscopia na Região do Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR)

A análise de FTIR foi realizada a fim de realizar uma caracterização estrutural dos principais grupos funcionais presentes no material. A Tabela 4 mostra as bandas mais relevantes observadas no espectro de FTIR para o compósito obtido (Figura 17).

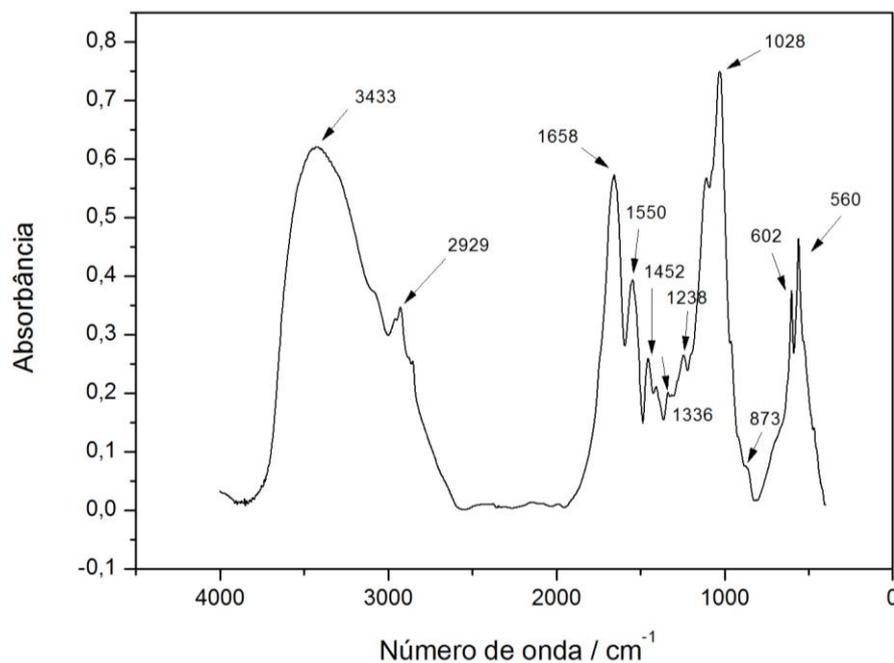
Tabela 4 - Principais grupamentos observados no espectro de infravermelho para o compósito de colágeno/nanohidroxiapatita.

Comprimento de onda (cm ⁻¹)	Atribuição
3433	Estiramento de grupos N-H (Amida A) e estiramento de grupos O-H
2929	Estiramento assimétrico de grupos CH ₂ (Amida B)
1658	Estiramento de grupos C=O (Amida I)
1550	Deformação de grupos N-H acoplado com

	estiramento de grupos C-N (Amida II)
1452	Deformação de grupos C-H e estiramento de grupos CO_3^{2-}
1336	Estiramento de grupos C=O de cadeia longa
1238	Deformação angular de grupos N-H acoplado com estiramento de grupos C-N (Amida III)
1028	Estiramento de grupos P-O
873	Estiramento de grupos P-OH
602	Estiramento de grupos P=O
560	Estiramento de grupos P=O

Fonte: Elaborada pela autora.

Figura 17 - Espectro de FTIR para o compósito obtido.



Fonte: Elaborada pela autora.

Foram observadas bandas relacionadas à proteína em 3433 cm^{-1} (Amida A), 2929 cm^{-1} (Amida B), 1658 cm^{-1} (Amida I), 1550 cm^{-1} (Amida II), 1240 cm^{-1} (Amida III), 1450 cm^{-1} (anéis pirrolidínicos da prolina e da hidroxiprolina) e 1336 cm^{-1} correspondente ao grupamento carboxila ($-\text{COO}^-$) (VEERURAJ *et al.*, 2013; YU *et al.*, 2014; SINGH *et al.*, 2011; LIU *et al.*, 2014; VEERURAJ *et al.*, 2015; SOCRATES, 2001; LI *et al.*, 2013). Essa última banda, em comparação ao espectro de colágeno, sem deposição mineral, é menos intensa devido à ligação química entre os íons Ca^{2+} da HA com os grupamentos $-\text{COO}^-$ do colágeno (KIKUCHI *et al.*, 2001).

Foi observado um alargamento da banda em 3433 cm^{-1} para o compósito, em comparação ao colágeno puro. Esta banda é associada à vibração de estiramento de grupos N-H, que ocorre no intervalo de $3400\text{--}3440\text{ cm}^{-1}$, e a estiramento de grupos O-H, relativo a grupos hidroxilas, que apresenta intervalo vibracional em $3500\text{--}3200\text{ cm}^{-1}$ (WAHL e CZERNUSZKA, 2006).

As bandas em 1028 cm^{-1} , 602 cm^{-1} e 560 cm^{-1} foram atribuídas aos modos vibracionais dos íons PO_4^{3-} , associadas a estiramento de grupos P-O e de grupos P=O (WENPO *et al.*, 2015; SOCRATES, 2001.) A análise FTIR, além de confirmar a deposição de HA sobre as fibras de colágeno, também forneceu informações adicionais sobre como a hidroxiapatita foi formada sobre a matriz colagenosa. Usualmente, a formação de nanohidroxiapatita a partir de soluções aquosas é precedida por uma fase precursora, geralmente cálcio fosfato amorfo (ACP), $\text{Ca}_2(\text{PO}_4)_3$, ou fosfato octacálcio (OCP), $\text{Ca}_8\text{H}_2(\text{PO}_4)_6 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, que se hidrolisa para formar uma fase mais estável de HA. A presença da banda dupla de PO_4^{3-} a 602 cm^{-1} e 560 cm^{-1} , sugere fortemente que esta fase precursora é o fosfato octacálcico (HUTCHENS, 2006; SASKA *et al.*, 2011; DUARTE, 2014). Antes da mineralização, o precursor conduz a uma complexação e organização dos cátions de cálcio, antes de se combinarem com o fosfato. O OCP, por possuir estrutura química próxima à hidroxiapatita, $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$, é considerado um precursor da hidroxiapatita biológica. Quando o precursor é ACP, observa-se uma única banda característica no lugar de duas (HUTCHENS, 2006; DUARTE, 2014).

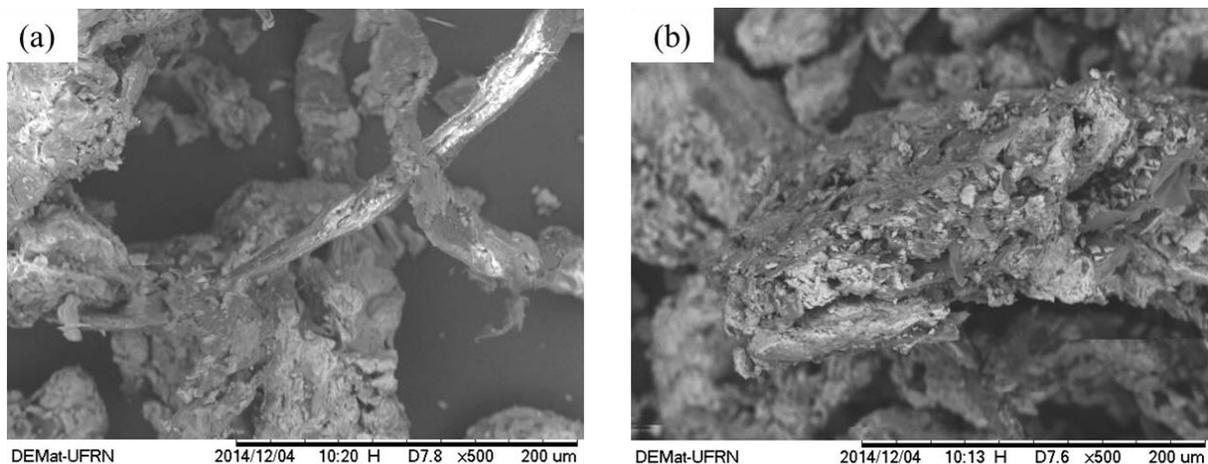
A banda em 1420 cm^{-1} , também característica de CO_3^{2-} , que apresenta intervalo vibracional em $1530\text{--}1320\text{ cm}^{-1}$, indicam a formação de uma hidroxiapatita carbonatada em substituição aos grupamentos PO_4^{3-} (WENPO *et al.*, 2015). Wopenka e Pasteris (2005) afirmam que substituição de PO_4^{3-} por CO_3^{2-} leva a um déficit de carga negativa, sendo compensado pela liberação de íons Ca^{2+} a fim de equilibrar as cargas na estrutura da

nanohidroxiapatita. O processo de fabricação do compósito é realizado sem controle da atmosfera e com movimentação do meio reacional. É possível que o gás carbônico presente no ar, em contato com a solução aquosa da reação, reaja incorporando o grupamento CO_3^{2-} ao processo. A presença discreta de um ombro na banda de HPO_4^{2-} , em 873 cm^{-1} , indica a formação de nanohidroxiapatita deficiente em cálcio (ZHANG e ZHANG, 2011).

5.3.2. Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

As características morfológicas do compósito de colágeno e nanohidroxiapatita foram estudadas através das imagens obtidas por Microscopia Eletrônica de Varredura (Figura 18).

Figura 18 – Imagens de MEV do compósito de colágeno/nanohidroxiapatita: (a) Aumento 500x; (b) Aumento 600x.



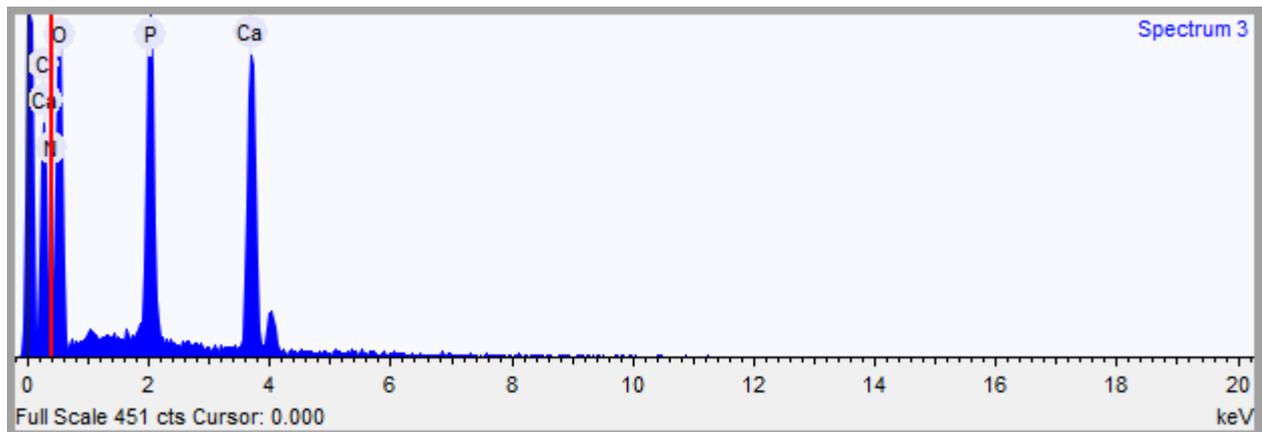
Fonte: Elaborada pela autora.

Podemos observar que partículas de hidroxiapatita foram depositadas na superfície da matriz de colágeno sem orientação definida. Campos (2008) afirma que a deposição dos nanocristais de hidroxiapatita na superfície do colágeno é promovida pelo acúmulo de íons Ca^{2+} nos grupos carboxila ($-\text{COO}^-$) presentes na matriz colagenosa, caracterizando a primeira fase da nucleação da hidroxiapatita. Micrografias semelhantes foram obtidas por Liu (2008), que desenvolveu compósitos de colágeno bovino e hidroxiapatita nanoestruturada; Sasmal e Begam (2014), que desenvolveram compósitos de colágeno de pele de peixe e hidroxiapatita em tamanho micro e Ficai *et al.* (2013), que desenvolveram compósitos de colágeno humano e hidroxiapatita em escala micrométrica avaliando a influência do pH durante a elaboração do compósito.

5.3.3. Espectroscopia de Energia Dispersiva (EDS)

A técnica analítica de Espectroscopia de Energia Dispersiva foi utilizada para caracterizar quimicamente as amostras através da análise elementar. O espectro obtido após a análise é mostrado na Figura 19 e seus dados são apresentados na Tabela 5.

Figura 19 - Espectro de EDS dos compósitos de colágeno/ nanohidroxiapatita.



Fonte: Elaborada pela autora.

Tabela 5 - Análise química por EDS do compósito de colágeno e nanohidroxiapatita.

ELEMENTO	% MASSA
Carbono	18,897
Nitrogênio	1,386
Fósforo	5,723
Cálcio	8,792
Oxigênio	65,202

Fonte: Elaborada pela autora.

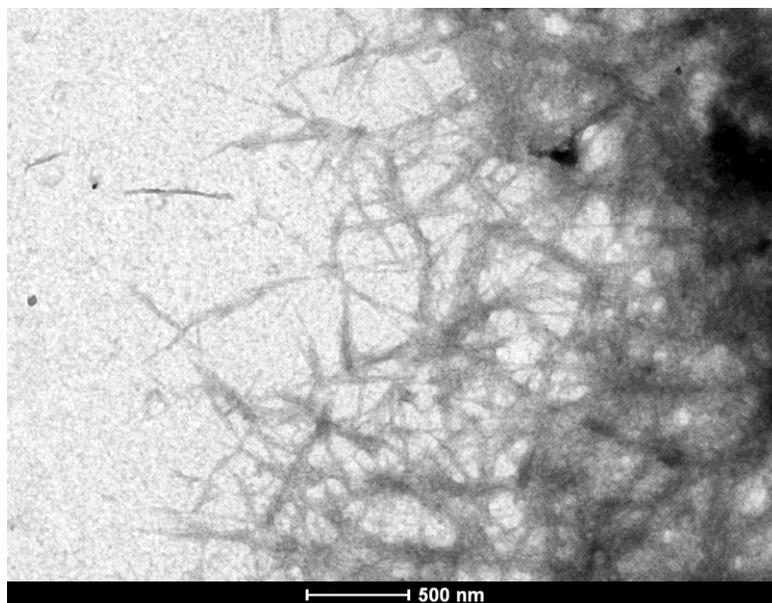
Foi observada a presença dos picos de carbono (C), nitrogênio (N) e oxigênio (O), indicando a preservação da composição das fibras de colágeno utilizadas na produção dos compósitos. Adicionalmente, existem picos de cálcio (Ca) e fósforo (P) devido ao processo de deposição mineral ocorrido durante a síntese do compósito. (Figura 21). Destaca-se a presença majoritária de oxigênio (O), uma vez que este está presente na estrutura do colágeno

e da nanohidroxiapatita. A análise de EDS não detectou a presença de outros elementos na amostra, evidenciando a pureza do material. Através da análise foi determinada a razão Ca/P, uma vez que essa relação é utilizada para caracterizar a composição dos fosfatos de cálcio. Araújo (2006) afirma que as apatitas podem apresentar diferentes composições. A fórmula química da hidroxiapatita estequiométrica é $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$, com relação cálcio/fósforo (Ca/P) igual a 1,67 e é o fosfato de cálcio mais estável e o menos solúvel de todos. A relação Ca/P determinada por via úmida foi de 1,54, valor próximo ao do osso em seu estágio inicial de mineralização, entretanto demonstrando que a hidroxiapatita é não-estequiométrica (Ca/P < 1,67) e ainda deficiente em cálcio (GUSTALDI e APARECIDA, 2010; ZHANG e ZHANG 2011).

5.3.4. Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET)

A análise de Microscopia Eletrônica de Transmissão foi realizada a fim de ser observada a presença das nanoestruturas de hidroxiapatita depositadas na matriz colagenosa. A Figura 20 mostra imagem obtida por MET do compósito de colágeno e hidroxiapatita.

Figura 20 - Micrografia por MET dos nanocristais de hidroxiapatita depositadas sobre o colágeno presente no compósito.



Fonte: Elaborada pela autora.

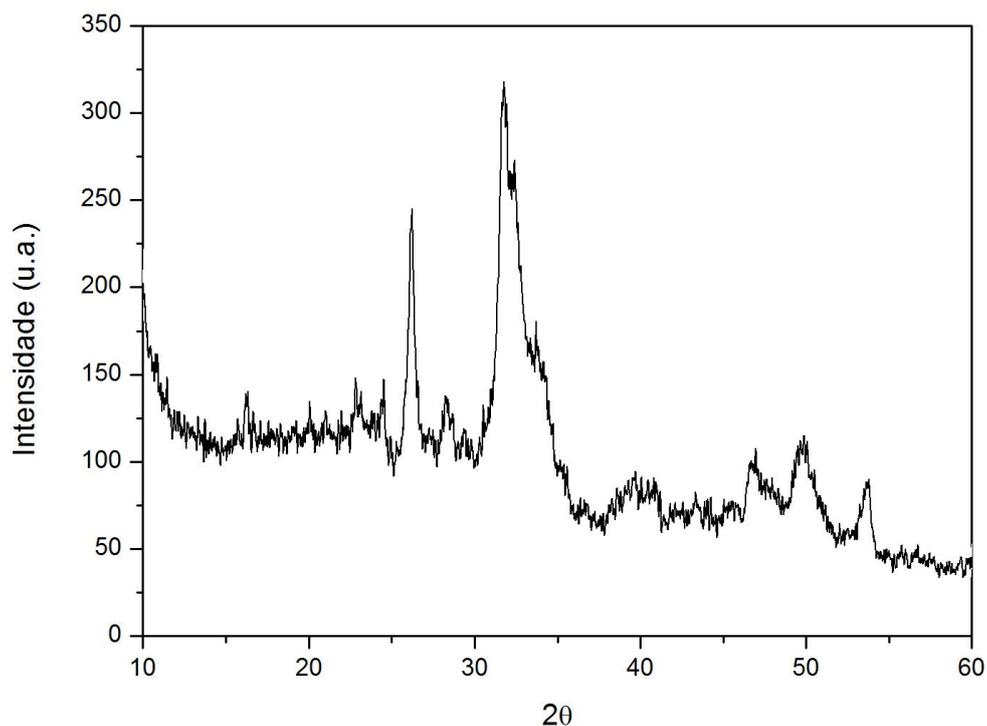
Foi observada a presença de nanoestruturas de hidroxiapatita que se caracterizam por se apresentarem na forma de agulhas com largura média de 21,53 nm. Esses resultados estão próximos aos encontrados por Rubin *et al.* (2003) que realizaram um estudo de análise por

MET de nanoestruturas em osso trabecular humano com e sem perfil osteoporótico. Eles observaram que nanocristais de hidroxiapatita depositados sobre fibrilas de colágeno em ossos humanos apresentam morfologia de agulha com largura e comprimento médios de $27,3 \pm 3,5$ nm e $57,0 \pm 6,7$ nm, respectivamente. Wang e Liu (2014) desenvolveram compósitos de colágeno bovino com deposição de hidroxiapatita e sugerem que nanocristais de hidroxiapatita apresentam largura média entre 10-30 nm com comprimentos variados em crescem ao longo das fibrilas de colágeno.

5.3.5. Difração de Raios-X (DRX)

A análise de Difração de Raios-X foi realizada com o objetivo de se investigar as características cristalográficas do material. A Figura 21 mostra o difratograma de Raios-X do compósito obtido.

Figura 21 – Difratograma de Raios-X do compósito de colágeno e nanohidroxiapatita.



Fonte: Elaborada pela autora.

Foi possível observar a presença de picos característicos da nanohidroxiapatita em $2\theta = 31,7^\circ$, $2\theta = 26,9^\circ$ e $2\theta = 46,9^\circ$. Observa-se ainda que a nanohidroxiapatita formada durante a elaboração do compósito apresenta baixa cristalinidade. Araújo (2008) sugere que a cristalinidade da nanohidroxiapatita pode ser avaliada qualitativamente pelos picos de difração de raios-X, pois amostras contendo picos acentuados e agudos tem maior

crystalinidade do que amostras que apresentem picos de difração largos e de baixa intensidade. O baixo índice de crystalinidade deve-se a ausência da etapa de sinterização durante a elaboração do compósito. A hidroxiapatita tratada a altas temperaturas tem crystalinidade mais pronunciada, devido a maior difusão de moléculas dentro da amostra e permite que o material amorfo existente no meio possa aderir aos cristais, fazendo-os crescer até alcançar tamanhos consideráveis. A princípio, a nanohidroxiapatita de menor crystalinidade se aproxima mais aquela do osso, já que ainda possui certa atividade química nos cristais menos perfeitos (MALZAC,2008).

6. CONCLUSÃO

Obteve-se com sucesso colágeno extraído de pele de Tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) com alto grau de pureza. Com a caracterização do colágeno observou-se que este apresentou morfologia adequada e superfície livre de impurezas e ainda que sua estrutura química foi mantida durante a extração, apresentando bandas de absorção no espectro de infravermelho características da proteína. Observou-se também a integridade da tripla hélice foi preservada, excluindo-se a possibilidade de desnaturação da proteína, que teve seu início de desnaturação em torno de 30°C. Obteve-se também sucesso na produção de compósito de colágeno e nanohidroxiapatita. A caracterização do compósito mostrou que este apresentou composição estrutural esperada, com bandas de absorção no infravermelho características. O compósito obtido apresentou ainda características químicas, morfológicas e estruturais semelhantes às dos ossos naturais, como relação $Ca/P < 1,67$, caracterizando uma hidroxiapatita deficiente em cálcio, presença de carbonatos em sua composição, baixa cristalinidade e ainda cristais de hidroxiapatita em escala nanométrica. Assim, o material apresentou características adequadas para um potencial uso como enxerto ósseo. Porém trabalhos futuros devem ser conduzidos no sentido de avaliar estudos *in vitro* e a bioatividade do biomaterial.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABEROUMAND, A. Comparative study between different methods of collagen extraction from fish and its properties. **World Applied Sciences Journal**, v. 16, n. 3, p. 316-319, 2012.

AHMAD, M.; BENJAKUL, S. Extraction and characterisation of pepsin-solubilised collagen from the skin of unicorn leatherjacket (*Aluterus monoceros*). **Food Chemistry**, v. 120, p. 817-824, 2010.

AHMAD, M.; BENJAKUL, S.; NALINANON, S. Compositional and physicochemical characteristics of acid solubilized collagen extracted from the skin of unicorn leatherjacket (*Aluterus monoceros*). **Food Hydrocolloids**, v. 24, p. 588-594, 2010.

ALFARO, A. T.; SILVA, E. F. Propriedades reológicas da gelatina obtida a partir de pele de tilápia (*Oreochromis niloticus*). **Revista Instituto Adolfo Lutz**, v. 69, n. 4, p. 555-561, 2010.

ALLAMAN, I. B.; REIS NETO, R. V.; FREITAS, R. T. F.; FREATO, T. A.; LAGO, A. A.; COSTA, A. C.; LIMA, R. R. Weight and morphometric growth of different strains of tilapia (*Oreochromis sp.*). **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 42, n. 5, p.305-311, 2013.

ANGELE, P.; JOCHEN ABKEB, J.; KUJATA, R.; FALTERMEIERA, H.; SCHUMANNA, D.; NERLICHA, M.; KINNERA, B.; ENGLERTA, C.; RUSZCZAKC, Z.; MEHRLC, R.; MUELLE, R. Influence of different collagen species on physico-chemical properties of crosslinked collagen matrices. **Biomaterials**, v. 25, p. 2831–2841, 2004.

AOAC. **Official methods of analysis**. 16. ed. Washington, DC: Association of Official Analytical Chemists, 1995.

ARAÚJO, T. S. **Produção de hidroxiapatita pura e dopada para aplicação em biosensores**. Sergipe, 2006. Dissertação (Mestrado em Física) - Universidade Federal de Sergipe, 2006.

ARAÚJO, J. C.; SENA, L.; BASTOS, I. N.; SOARES, G. D. A. Síntese da hidroxiapatita e refinamento estrutural por Difração de Raios-X. **Química Nova**, v. 30, n. 8, p. 1853-1859, 2007.

ARAUJO, J. C.; MOREIRA, E. L.; MORAES, V. C. A.; MOREIRA, A. P. D. Análise estrutural de uma hidroxiapatita carbonatada pelo método de Rietveld aplicando funções de perfil diferentes. **Revista Escola de Minas**, v.61, n.4, p. 479-484, 2008.

ARRUDA, L. F. **Aproveitamento do resíduo do beneficiamento da tilápia do Nilo para obtenção de silagem e óleo como subprodutos**. Piracicaba, 2004. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos), Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Universidade de São Paulo, 2004.

BEGAM, H.; SASMAL, P. Extraction of Type-I Collagen from Sea Fish and Synthesis of Hap/Collagen Composite. **Procedia Materials Science**, v. 5, p. 1136-1140, 2014.

BRASIL. Ministério da Pesca e Aquicultura. **Boletim estatístico da pesca e aquicultura – 2011**. Brasília, DF, 2013.

BOSCOLO, W. R.; CARMINO, H.; SOARES, C. M.; FURUYA, W. M.; MEURER, F. Desempenho e características de carcaça de machos revertidos de Tilápias do Nilo (*Oreochromis niloticus*), linhagens tailandesa e comum, nas fases inicial e de crescimento. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 30, n. 5, p. 1391-1396, 2001.

CALIMAN, L. B. **Síntese e caracterização de hidroxiapatita obtida a partir da casa de ovo de avestruz**. Vitória, 2011. Dissertação (Engenharia Metalúrgica e de Materiais), Instituto Federal do Espírito Santo, 2011.

CAMARGO, P. H. C.; SATYANARAYANA, K. G.; WYPYCH, F. Nanocomposites: synthesis, structure, properties and new application opportunities. **Materials Research**, v. 12, n. 1, p. 1-39, 2009.

CAMPOS, D. M. **Produção e caracterização de colágeno tipo I e de compósitos**

hidroxiapatita-colágeno para regeneração óssea. Rio de Janeiro, 2008. Dissertação (Mestrado em Ciências em Engenharia Metalúrgica e de Materiais), Universidade Federal do Rio de Janeiro, 2008.

CANTY, E. G.; KADLER, K. E. Procollagen trafficking, processing and fibrillogenesis. **Journal of Cell Science**, v. 118, n. 1, p. 1341-1353, 2005.

CARVALHO, E.D. Avaliação dos impactos da piscicultura em tanques-rede nas represas dos grandes tributários do alto Paraná (Tietê e Paranapanema): o pescado, a ictiofauna agregada e as condições limnológicas. **Relatório Científico (FAPESP)**. Botucatu, SP, p. 46, 2006.

CARVALHO, G. G. P.; PIRES, A. J. V.; VELOSO, C. M.; SILVA, F. F.; CARVALHO, B. M. A. Silagem de resíduo de peixes em dietas para alevinos de tilápia-do-nilo. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.35, n.1, p.126-130, 2006.

COSTA, A. C. F. M.; LIMA, M. G.; LIMA, L. H. M. A.; CORDEIRO, V. V.; VIANA, K. M. S.; SOUZA, C. V.; LIRA, H. L. Hidroxiapatita: Obtenção, caracterização e aplicações. **Revista Eletrônica de Materiais e Processos**, v. 4.3, p. 29-38, 2009.

COSTA JÚNIOR, E. S.; MANSUR, H. S. Preparação e caracterização de blendas de quitosana/poli(álcool vinílico) reticuladas quimicamente com glutaraldeído para aplicação em engenharia de tecido. **Química Nova**, v.31, n.6, p. 1460-1466, 2008.

CUNHA, M. A. **Síntese e caracterização de hidroxiapatita nanoestruturada obtidos por aspersão de solução em chama**. Porto Alegre, 2010. Trabalho de Diplomação (Graduação em Engenharia de Materiais), Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2010.

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

DHARA, S.; DATTA, P.; PAL, P.; SARKAR, S. D. Processing and Industrial Aspects of

Fish-scale Collagen: A Biomaterials Perspective. *In*: KIM, S.-K. **Marine Proteins and Peptides: Biological Activities and Applications**. 1. ed. Chichester: John Wiley & Sons, Ltd., 2013. cap. 30, p. 589-629.

DOROZHKIN, S. V. Biological and medical significance of calcium phosphates. **Angewandte Chemie International Edition**, v. 41, p. 3130-3146, 2002.

DUARTE, E. B. **Produção de nanocompósitos de celulose bacteriana e hidroxiapatita como rota para valorização de resíduos agroindustriais**. Fortaleza, 2014. Tese (Doutorado em Engenharia e Ciências de Materiais), Universidade Federal do Ceará, 2014.

E´GUES, M. A. M. **Compósito de colágeno com silicato e hidroxiapatita como material para endodontia**. São Carlos, 2005. Dissertação (Mestrado em Bioengenharia), Universidade de São Paulo, 2005.

FICAI, A.; ALBU, M. G.; BIRSAN, M.; SONMEZ, M.; FICAI, D.; TRANDAFIR. V.; ANDRONESCU, E. Collagen hydrolysate based collagen/hydroxyapatite composite materials. **Journal of Molecular Structure**, v. 1037, p. 154–159, 2013.

FRANCO, M. L. R. S.; FRANCO, N. P.; GASPARINO, E.; DORADO, D. M.; PRADO, M.; VESCO, A. P. D. Comparação das peles de Tilápia do Nilo, Pacu e Tambaqui: histologia, composição e resistência. **Archivos de Zootecnia**, v. 62, n. 237, p. 21-32, 2013.

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

FULMER, M. T.; MARTIN, R. I.; BROWN, P. W. Formation of Calcium deficient Hydroxyapatite at near-physiological temperature. **Journal of Materials Science: Materials in Medicine**, v. 3, p. 299-305, 1992.

GOMES, L. C.; DI LELLO, B. C.; CAMPOS, J. B.; SAMPAIO, M. Síntese e

caracterização de fosfatos de cálcio a partir da casca de ovo de galinha. **Cerâmica**, v. 58, p. 448-452, 2012.

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

GOUVEIA, D. S. **Obtenção de pós nanométricos de hidroxiapatita sintetizados com magnésio utilizando ultra-som**. São Paulo, 2008. Tese (Doutorado em Ciências), Universidade de São Paulo, 2008.

GUSTALDI, A. C.; APARECIDA, A. H. Fosfatos de cálcio de interesse biológico: importância como biomateriais, propriedades e métodos de obtenção de recobrimentos. **Química Nova**, v. 33, n. 6, p. 1352-1358, 2010.

HANEMANN, T.; SZABO, D. V. Polymer-nanoparticle composites: from synthesis to modern applications. **Materials**, v. 3, p. 3468–3517, 2010.

HEIDARIA, F.; E. BAHROLOLOOMA, M. E.; VASHAEED, D.; TAYEB, L. *In situ* preparation of iron oxide nanoparticles in natural hydroxyapatite/chitosan matrix for bone tissue engineering application. **Ceramics International**, v. 41, n. 2B, p.3094-3100, 2015.

HELCKE, T. Gelatin, the food technologist's friend or foe? **International Food Ingredients**, v. 1, p. 6–8, 2000.

HOINACKI, E. **Peles e couros: origens, defeitos e industrialização**. 2. ed. Porto Alegre: Editora Henrique d'Ávila Bertaso, 1989.

HSU, F. Y., CHUEH, S. C. Microspheres of hydroxyapatite/reconstituted collagen as supports for osteoblast cell growth. **Biomaterials**, v. 20, p. 1931–1936, 1999.

HUANG, Y. -C.; TZU-WEI WANG, T. -W.; SUN, J. -S.; LIN, F. -H. Epidermal morphogenesis in an in-vitro model using a fibroblasts-embedded collagen scaffold.

Journal of Biomedical Science, v. 12, p. 855–867, 2005.

HUANG, Y. -R.; SHIAU, C. -Y.; CHEN, H. -H.; HUANG, B. -C. 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, 2011.

HUTCHENS, S. A.; BENSON, R. S.; EVANS, B. R.; O'NEILL, H. M.; RAWN, C. J. Biomimetic synthesis of calcium-deficient hydroxyapatite in a natural hydrogel. **Biomaterials**, v. 27, p. 4661-4670, 2006.

JEEVITHAN, E.; WU, W.; NANPING, W.; LAN, H.; BAO, B. Isolation, purification and characterization of pepsin soluble collagen isolated from silvertip shark (*Carcharhinus albimarginatus*) skeletal and head bone. **Process Biochemistry**, v. 49, p. 1767–1777, 2014.

JIA, L.; DUANA, Z.; FANA, D.; MIA, Y.; HUIA, J.; CHANG, L. Human-like collagen/nano-hydroxyapatite scaffolds for the culture of chondrocytes. **Materials Science and Engineering: C**, v. 33, p. 727–734, 2013.

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

KAWACHI, E. Y.; BERTRAN, C. A.; REIS, R. R.; ALVES, O. L. Biocerâmicas: Tendências e perspectivas de uma área interdisciplinar. **Química Nova**, v. 23, n. 4, p. 518-522, 2000.

KIKUCHI, M.; MATSUMOTO, H. N.; YAMADA, T.; KOYAMA, Y.; TAKAKUDAB, K.; TANAKA, J. Glutaraldehyde cross-linked hydroxyapatite/collagen self-organized nanocomposites. **Biomaterials**, v. 25, p. 63–69, 2004.

KIKUCHI, M.; ITOH, S.; ICHINOSE, S.; SHINOMIYA, K.; TANAKA, J. Self-organization mechanism in a bone-like hydroxyapatite/collagen nanocomposite

synthesized in vitro and its biological reaction in vivo. **Biomaterials**, v. 22, n. 13, p. 1705-1711, 2001.

KITTIPHATTANABAWON, P.; BENJAKUL, S.; VISESSANGUAN, W.; SHAHIDI F. Isolation and characterization of collagen from the cartilages of brownbanded bamboo shark (*Chiloscyllium punctatum*) and blacktip shark (*Carcharhinus limbatus*). **LWT – Food Science Technology**, v. 43, p. 792–800, 2010.

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

KOIDE, T.; HOMMA, D. L.; ASADA, S.; KITAGAWA, K. Self-Complementary Peptides for the Formation of Collagen-Like Triple Helical Supramolecules. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 15, p. 5230-5233, 2005.

LEE, C. H.; SINGLA, A.; LEE, Y. Biomedical applications of collagen. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 221, p. 1-22, 2001.

LEGEROS, R. Z. Calcium phosphate materials in restorative dentistry: A review. **Advances in Dental Research**, v. 2, p. 164-180, 1988.

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

LIAN, X.; LIU, H.; WANG, X.; XU, S.; CUI, F.; BAI, X. Antibacterial and biocompatible properties of vancomycin-loaded nano-hydroxyapatite/collagen/poly (lactic acid) bone substitute. **Progress in Natural Science: Materials International**, v. 23, p. 549-556, 2013.

LIBONATI, F.; NAIR, A. K.; VERGANI, L.; BUEHLER, M. J. Mechanics of collagen–

hydroxyapatite model nanocomposites. **Mechanics Research Communications**, v. 58, p. 17-23, 2014.

LIU, D.; ZHANGA, X.; LIA, T.; YANGA, H.; ZHANGA, H.; REGENSTEINC, J. M.; ZHOU, P. Extraction and characterization of acid- and pepsin-soluble collagens from the scales, skins and swim-bladders of grass carp (*Ctenopharyngodon idella*). **Food Bioscience**, v. 9, p. 68-74, 2015.

LIU, X.; JIANG, Y.; HE, H.; PING, W. Hydrogen peroxide-induced degradation of type I collagen fibers of tilapia skin. **Food Structure**, v. 2, n. 1-2, p. 41-48, 2014,

LIU, C.-Z. Biomimetic synthesis of collagen/nano-hydroxyapatite scaffold for tissue engineering. **Journal of Bionic Engineering**, v. 5, apêndice, p. 01–08, 2008.

LIU, Q.; DING, J.; MANTE, F. K.; WUNDER, S. L.; BARAN, G. R. The role of surface functional groups in calcium phosphate nucleation on titanium foil: a self-assembled monolayer technique. **Biomaterials**, v. 23, n. 15, p. 3103-3111, 2002.

MACEDO, C. F.; SIPAÚBA-TAVARES, L. H. Eutrofização e qualidade da água na piscicultura: consequências e recomendações. **Boletim do Instituto de Pesca**, v. 36, n. 2, p. 149 – 163, 2010.

MALZAC, A. **Hidroxiapatita dopada pelo gálio para potencial uso em ortopedia**. Campo Grande, 2008. Tese (Doutorado em Ciências da Saúde), Universidade Federal do Mato Grosso do Sul, 2008.

MAVROPOULOS, E. **A hidroxiapatita como removedora de chumbo**. Rio de Janeiro, 1999. Dissertação (Mestrado em Saúde Pública), Fundação Oswaldo Cruz, 1999.

MAZZA, D. Produção de tilápia tem expansão de 50% no CE. **Diário do Nordeste**, Fortaleza, 16 março 2012. Negócios. Disponível em: <<http://diariodonordeste.globo.com/materia.asp?codigo=1115698>>. Acesso em: 11 jan. 2014.

MORAIS, J. P. S.; CLAUDINO, R. L.; FIGUEIRÊDO, M. C. B.; SAMPAIO, A. P. C.; MELO, E. F.; SOUZA FILHO, M. S. M.; RODRIGUES, M. L. L.; FIGUEIREDO, G. I.; ROSA, M. F. **Balço de massa na obtenção de carne mecanicamente separada (CMS) de tilábia**. Fortaleza: Embrapa Agroindústria Tropical, 2013, p. 1-15. (Embrapa Agroindústria Tropical. Documentos, 164).

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

NEKLYUDOV, A. D. Nutritive fibers of animal origin: collagen and its fractions as essential components of new and useful food products. **Applied Biochemistry Microbiology**, v. 39, n. 3, p. 229-238, 2003.

NELSON, D. L.; COX, M. M. **Lehninger - Princípios de Bioquímica**. 6. ed. Porto Alegre: Artmed, 2014.

PADUA, D. M. C. **Fundamentos de piscicultura**. 2 ed. Goiania: UCG, 2001. p. 341.

PATI, F.; DHARA, S.; ADHIKARI, B. Fish Collagen: A Potential Material for Biomedical Application. In: Students' Technology Symposium of Indian Institute of Technology Kharagpur, 2010. Kharagpur. **Anais**, 2010, p. 34-38.

PEREIRA, M. M.; VASCONCELOS, W. L.; ZAVAGLIA, C. A. C. **Materiais cerâmicos - Ciência e aplicação como biomateriais**. In: MANSUR, H. S.; PEREIRA, M. M.; ORÉFICE, R. L. Biomateriais: Fundamentos e Aplicações. 1 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2012. cap. 3.

PINHEIRO, D. M.; PORTO, K. R. A.; MENEZES, M. E. S. **A química dos alimentos: carboidratos, lipídios, proteínas e minerais**. Maceió: EDUFAL, 2005.

RIGO, E. C. S.; GEHRKE, S. A.; CARBONARI, M. Síntese e caracterização de

hidroxiapatita obtida pelo método da precipitação. **Dental Press Implantology**, v. 1, n. 3, p. 39-50, 2007.

RODRIGUEZ-LORENZO, L. M.; VALLET-REGÍ, M. Controlled Crystallization of Calcium Phosphate Apatites. **Chemistry of Materials**, v. 12, n.8, p. 2460-2465, 2000.

ROSA, M. F.; SOUZA FILHO, M S. M.; FIGUEIREDO, M. C. B.; MORAIS, J. P. S.; SANTAELLA, S.T., LEITÃO, R.C. Valorização de resíduos da agroindústria. In: Simpósio Internacional sobre Gerenciamento de Resíduos Agropecuários e Agroindustriais, Foz do Iguaçu. **Anais**, 2011, p. 98.

RUBIN, M. A.; JASIUK, I.; TAYLOR, J.; RUBIN, J.; GANEY, T.; APKARIAN, R. P. TEM analysis of the nanostructure of normal and osteoporotic human trabecular bone. **Bone**, v. 33, p. 270–282, 2003.

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

SANTOS, L. A. **Desenvolvimento de cimento de fosfato de cálcio reforçado por fibras para uso na área médico-odontológica**. Campinas, 2002. Tese (Doutorado em Engenharia Mecânica), Universidade Estadual de Campinas, 2002.

SANTOS, L. C. **Compósito de hidroxiapatita sintética e lignina como promotor de osseointegração entre implante metálico e tecido ósseo: estudo experimental em cães**. Viçosa, 2012. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária), Universidade Federal de Viçosa, 2012.

SASKA, S.; BARUD, H. S.; GASPAR, A. M. M.; MARCHETTO, R.; RIBEIRO, S. J. L.; MESSADDEQ, Y. Bacterial cellulose-hydroxyapatite nanocomposites for bone regeneration. **International Journal of Biomaterials**, v. 2011, 2011.

SASMAL, P.; BEGAM, H. Extraction of type-I collagen from sea fish and synthesis of Hap/collagen composite. **Procedia Materials Science**, v. 5, p. 1136-1140, 2014.

SCHUETZ, T.; RICHMOND, N.; HARMON, M. E.; SCHUETZ, J.; CASTANEDA, L.; SLOWINSKA, K. The microstructure of collagen type I gel cross-linked with gold nanoparticles. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 101, p. 118-125, 2013.

SENA, L. A. **Produção e caracterização de compósitos hidroxiapatita-colágeno para aplicações biomédicas**. Rio de Janeiro, 2004. Tese (Doutorado em Ciências em Engenharia Metalúrgica e de Materiais), Universidade Federal do Rio de Janeiro, 2004.

SENARATNE, L. S.; PARK, P. -J.; KIM, S. -K. Isolation and characterization of collagen from brown backed toadfish (*Lagocephalus gloveri*) skin. **Bioresource Technology**, v. 97, p. 191–197, 2006.

SILVA, T. F.; PENNA, A. L. B. Colágeno: Características químicas e propriedades funcionais. **Revista Instituto Adolfo Lutz**, v. 71, n. 3, p. 530-539, 2012.

SILVA, F. M.; LACERDA, P. S. B.; JONES JUNIOR, J. Desenvolvimento Sustentável e Química Verde. **Química Nova**, v. 28, n. 1, p. 103-110, 2005.

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

SOCRATES, G. **Infrared and Raman characteristic group frequencies: tables and charts**. 3. ed. Chichester: John Wiley & Sons, Ltd., 2001. cap. 10, p. 143-148.

TAMILMOZHI, S.; VEERURAJ, A.; ARUMUGAM, M. Isolation and characterization of acid and pepsin-solubilized collagen from the skin of sailfish (*Istiophorus platypterus*). **Food Research International**, v. 54, n. 2, p. 1499-1505, 2013.

TECHATANAWATA, S.; SURARIT, R.; SUDDHASTHIRA, T.; KHOVIDHUNKI, S. - O. P. Type I collagen extracted from rat-tail and bovine Achilles tendon for dental application: a comparative study. **Asian Biomedicine**, v. 5, p. 787–798, 2011.

TEJEDA-MONTESA, E.; KLYMOV, A.; NEJADNIK, M. R.; ALONSO, M.; RODRIGUEZ-CABELLO, J. C.; WALBOOMERS, X. F.; MATA, A. Mineralization and bone regeneration using a bioactive elastin-like recombinant membrane. **Biomaterials**, v. 35, n. 9, p. 8339-8347, 2014.

UI-ISLAM, M.; KHATTAK, W. A.; ULLAH, M. W.; KHAN, S.; PARK, J. K. Synthesis of regenerated bacterial cellulose-zinc oxide nanocomposite films for biomedical applications. **Cellulose**, v. 21, p. 433-447, 2014.

VAZ, G. J. O. **Propriedades de biocerâmicas porosas de fosfato de cálcio obtidas com matérias-primas de origem orgânica e sintética**. Belo Horizonte, 2007. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Materiais), Universidade Federal de Ouro Preto, 2007.

VEERURAJ, A.; ARUMUGAM, M.; BALASUBRAMANIAN, T. Isolation and characterization of thermostable collagen from the marine eel-fish (*Evenchelys macrura*). **Process Biochemistry**, v. 48, p. 1592-1602, 2013.

VEERURAJ, A.; ARUMUGAM, M.; AJITHKUMAR, T.; BALASUBRAMANIAN, T. Isolation and characterization of collagen from the outer skin of squid (*Doryteuthis singhalensis*). **Food Hydrocolloids**, v. 43, p. 708-716, 2015.

VIDOTTI, R.M.; GONÇALVES, G.S. Produção e caracterização de silagem, farinha e óleo de tilápia e sua utilização na alimentação animal. **Instituto de Pesca**, São Paulo, outubro, 2006. Disponível em: <<http://www.pesca.sp.gov.br>>. Acesso em: 11 jan. 2014.

WAHL, D.A., CZERNUSZKA, J.T. Collagen-Hydroxyapatite Composites for Hard Tissue Repair. **European Cells and Materials**, v. 11, p. 43-56, 2006.

WANG, L.; AN, X.; YANG, F.; XIN, Z.; ZHAO, L.; HU, Q. Isolation and characterisation of collagens from the skin, scale and bone of deep-sea redfish (*Sebastes mentella*). **Food Chemistry**, v. 108, p. 616-623, 2008.

WANG, L.; LIANG, Q.; CHEN, T.; WANG, Z.; XU, J.; MAA, H. Characterization of collagen from the skin of Amur sturgeon (*Acipenser schrenckii*). **Food Hydrocolloids**, v. 38, p. 104-109, 2014.

WANG, J.; LIU, C. Biomimetic collagen/hydroxyapatite composite scaffolds: fabrication and characterizations. **Journal of Bionic Engineering**, v. 11, p. 600–609, 2014.

WENPO, F.; GAOFENGA, L.; SHUYINGC, F.; YUANMINGD, Q.; KEYONG, T. Preparation and characterization of collagen–hydroxyapatite/pectin composite. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 74, p. 218-223, 2015.

WOPENKA, B.; PASTERIS, J. D. A mineralogical perspective on the apatite in bone. **Materials Science and Engineering C**, v. 25, p. 131–143, 2005.

YAN, M.; LI, B.; ZHAO, X.; REN, G.; ZHUANG, Y.; HOU, H.; ZHANG, X.; CHEN, L.; FAN, Y. Characterization of acid-soluble collagen from the skin of walleye pollock (*Theragra chalcogramma*). **Food Chemistry**, v. 107, p. 1581–1586, 2008.

YU, D.; CHI, C.-F.; WANG, B.; DING, G.-F.; LI, Z.-R. Characterization of acid- and pepsin-soluble collagens from spines and skulls of skipjack tuna (*Katsuwonus pelamis*). **Chinese Journal of Natural Medicines**, v. 12, n. 9, p. 712-720, 2014.

ZANABONI, G.; ROSSI, A.; ONANA, A. M. T.; TENNI, R. Stability and networks of hydrogen bonds of the collagen triple helical structure: Influence of pH and chaotropic nature of three anions. **Matrix Biology**, v. 19, p. 511- 520, 2000.

ZANIN, M. S.; RIGO, E. C. S.; BOSCHI, A. O. Recobrimento biomimético de hidroxiapatita com prétratamento álcali-térmico sobre aços inoxidáveis austeníticos. **Revista Brasileira de Engenharia Biomédica**, v. 23, n. 2, p. 117-122, 2007.

ZENG, S.; YIN, J.; YANG, S.; ZHANG, C.; YANG, P.; WUA, W. Structure and characteristics of acid and pepsin-solubilized collagens from the skin of cobia (*Rachycentron canadum*). **Food Chemistry**, v. 135, p. 1975–1984, 2012.

ZENG, S.-K.; ZHANG, C.-H.; LIN, H.; YANG, P.; HONG, P.-Z.; JIANG, Z. Isolation and characterisation of acid-solubilised collagen from the skin of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). **Food Chemistry**, v. 116, p. 879–883, 2009.

ZHANG, M.; LIU, W.; LI, G. Isolation and characterisation of collagens from the skin of largefin longbarbel catfish (*Mystus macropterus*). **Food Chemistry**, v. 115, p. 826–831, 2009.

ZHANG, H.; ZHANG, M. Characterization and thermal behavior of calcium deficient hydroxyapatite whiskers with various Ca/P ratios. **Materials Chemistry and Physics**, v. 126, n. 3, p. 642-648, 2011.