

**UNIVERSIDADE TECNOLÓGICA FEDERAL DO PARANÁ
ENGENHARIA DE BIOPROCESSOS E BIOTECNOLOGIA**

ANA JULIA RAUBER

**OBTENÇÃO DE COMPOSTOS DE ALTO VALOR AGREGADO A PARTIR
DE ESCAMAS DE PEIXE – UMA REVISÃO BIBLIOGRÁFICA**

**TOLEDO – PR
2021**

ANA JULIA RAUBER

**OBTENÇÃO DE COMPOSTOS DE ALTO VALOR AGREGADO A PARTIR
DE ESCAMAS DE PEIXES – UMA REVISÃO BIBLIOGRÁFICA**

Obtention of high value-added compounds from fish scales - A review

Trabalho de conclusão de curso de graduação apresentado como requisito para a obtenção do título de Bacharel em Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia da Universidade Tecnológica Federal do Paraná (UTFPR).

Orientador: Prof. Dr. Fabiano Bisinella Scheufele.

TOLEDO – PR

2021

FOLHA DE APROVAÇÃO

ANA JULIA RAUBER

**OBTENÇÃO DE COMPOSTOS DE ALTO VALOR AGREGADO A PARTIR
DE ESCAMAS DE PEIXE – UMA REVISÃO BIBLIOGRÁFICA**

Data da aprovação: 26 de agosto de 2021

Prof. Dr. Fabiano Bisinella Scheufele
Universidade Tecnológica Federal do Paraná

Prof. Dr. Renato Eising
Universidade Tecnológica Federal do Paraná

Profa. Dra. Caroline Ribeiro
Universidade Estadual do Paraná

TOLEDO

2021

RESUMO

As escamas de peixe fazem parte de uma vasta gama de resíduos gerados pela indústria de processamento de peixes, e a sua utilização é limitada devido à escassez de aplicações práticas e, conseqüentemente, baixo valor comercial, podendo causar danos ambientais se não destinadas corretamente. As escamas são formadas por um tecido ósseo, constituído por uma matriz de colágeno (fração orgânica), onde se depositam cristais de apatita (fração inorgânica). Estes constituintes possuem empregabilidade nas áreas de biomedicina, cosméticos, odontologia, tratamento de efluentes, biomateriais entre outros. Portanto, a utilização e valorização das escamas em aplicações de interesse comercial poderia reduzir significativamente impactos ambientais e proporcionar valor agregado. Neste contexto, objetivo deste trabalho foi apresentar uma revisão bibliográfica sobre os métodos de obtenção de colágeno e apatitas a partir de escamas de peixe, dando um possível direcionamento para o aproveitamento deste material. A análise dos detalhes técnicos e metodológicos, aspectos teóricos, vantagens e desvantagens das tecnologias utilizadas são relatadas e avaliadas neste estudo, além disso são exploradas as propriedades e aplicações do colágeno e apatitas obtidos e as técnicas para a caracterização destes materiais visando suas possíveis aplicações em diferentes segmentos.

Palavras-chave: colágeno; apatitas; escamas de peixe; biomateriais.

ABSTRACT

Fish scales are part of a wide range of waste generated by the fish industry, and their use is limited due to the few practical applications and low commercial value, therefore could cause environmental damage if not disposed of correctly. The scales are formed by bone tissue, constituted of a collagen matrix (organic fraction), where apatite crystals (inorganic fraction) are deposited. These components have applications in the areas of biomedicine, cosmetics, dentistry, effluent treatment, biomaterials, among others. Therefore, the use and valorization of scales in applications of commercial interest could reduce environmental impacts and provide added value. In this context, the objective of this work is to present a review of the methods of obtaining collagen and apatites from fish scales, giving a possible direction for the use of this material. The analysis of technical and methodological details, theoretical aspects, advantages and disadvantages of the technologies used are reported and evaluated in this study, in addition, the properties and applications of the collagen and apatites obtained are explored, as well as the techniques for the characterization of these materials with a view to their possible applications in different segments.

Keywords: collagen; apatites; fish scales; biomaterials.

Lista de abreviaturas e siglas

DRX – Difração de raios X

DSC – Varredura diferencial de colorimetria

DTG – Termogravimetria diferencial

EDX – Espectroscopia por energia dispersiva de raios X

FE-SEM – Microscopia eletrônica de varredura por emissão de campo

FT-IR – Espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier

HAp - Hidroxiapatitas

HPLC – Cromatografia líquida de alta eficiência

ICP-OS – Espectrometria de emissão ótica com plasma indutivamente acoplado

MEV – Microscopia eletrônica de varredura

pH_{ZPC} – pH no ponto de carga zero

SDS-PAGE - Eletroforese em gel de dodecil sulfato de sódio-poliacrilamida

SEC – Cromatografia de exclusão por tamanho

TEM – Microscopia eletrônica de transmissão

TGA – Termogravimetria

UV/Vis – Espectroscopia no ultravioleta visível

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	8
2	JUSTIFICATIVA.....	10
3	OBJETIVOS.....	11
3.1	Gerais	11
3.2	Específicos	11
4	METODOLOGIA	12
5	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	13
5.1	Aproveitamento de resíduos agroindustriais	13
5.2	Conceito de biorrefinaria	14
5.3	Cenário da produção de pescados e seus resíduos	14
5.4	Escamas de peixe.....	17
5.5	Composição das escamas de peixe	18
5.5.1	Fração orgânica: Colágeno	18
5.5.2	Fração mineral: Apatitas.....	21
5.6	Aplicações dos constituintes das escamas.....	23
5.6.1	Aplicações do colágeno.....	23
5.6.2	Aplicações das apatitas.....	25
5.7	Métodos de obtenção dos compostos	27
5.7.1	Extração do colágeno.....	27
<u>5.7.1.1</u>	<u>Pré-tratamento</u>	<u>32</u>
<u>5.7.1.2</u>	<u>Métodos de extração do colágeno.....</u>	<u>33</u>
5.7.1.2.1	<i>Hidrólise química</i>	34
5.7.1.2.2	<i>Hidrólise enzimática</i>	35
5.7.1.2.3	<i>Outros métodos</i>	36
<u>5.7.1.3</u>	<u>Métodos de purificação do colágeno</u>	<u>38</u>
5.7.1.3.1	<i>Precipitação e diálise.....</i>	38
5.7.1.3.2	<i>Outros métodos</i>	39
5.7.2	Extração de apatitas.....	40
<u>5.7.2.1</u>	<u>Pré-tratamento</u>	<u>44</u>
<u>5.7.2.2</u>	<u>Métodos de extração de apatitas</u>	<u>44</u>
5.7.2.2.1	<i>Calcinação.....</i>	45

5.7.2.2.2	<i>Hidrólise enzimática</i>	46
5.7.2.2.3	<i>Hidrólise alcalina</i>	47
5.7.2.2.4	<i>Outros métodos</i>	48
5.8	Técnicas analíticas e de caracterização dos biomateriais	49
5.8.1	Eletroforese em gel de dodecil sulfato de sódio-poliacrilamida (SDS-PAGE)	50
5.8.2	Cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC).....	51
5.8.3	Espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier (FTIR)	51
5.8.4	Difração de raios-X (DRX).....	52
5.8.5	Termogravimetria (TGA).....	53
5.8.6	Microscopia eletrônica de varredura (MEV)	54
5.9	Lacunas a serem exploradas	54
6	CONSIDERAÇÕES FINAIS	56
	REFERÊNCIAS	57

1 INTRODUÇÃO

A piscicultura brasileira é uma atividade que vem se desenvolvendo fortemente nos últimos anos e possui grande potencial devido aos recursos hídricos do país, a extensão territorial e ao clima favorável. O Paraná é o estado com maior produção de peixes de cultivo (PEIXEBR, 2019), e a maior produção se concentra na região oeste. As regiões de Toledo e Cascavel participam de aproximadamente 50% da produção estadual (EMATER, 2012).

Assim como qualquer outra produção agroindustrial, a indústria de processamento de peixes gera grandes quantidades de resíduos, sendo em sua maioria ossos, vísceras, barbatanas, pele e escamas. Esses materiais podem gerar impactos ambientais se não destinados corretamente, pois são ricos em matéria orgânica e inorgânica (FELTES *et al.*, 2010). Além disso, devido à sua composição, tais resíduos possuem componentes de interesse comercial de modo que sua recuperação agrega um elevado potencial econômico a ser explorado.

Neste sentido, existem maneiras ecológicas e rentáveis de utilizar os resíduos da produção de peixes para obtenção de produtos com alto valor agregado, tais como proteínas, aminoácidos, biodiesel, minerais, ácidos graxos ômega-3, vitaminas, antioxidantes, entre outros (HUANG; HSIAO; CHAI, 2011; RAMAKRISHNAN *et al.*, 2013a).

As escamas compõem cerca de 4% dos resíduos gerados na indústria de processamento de peixes, e muitas vezes não são reconhecidas como matéria-prima e fonte para outros produtos. Ainda que existam algumas aplicações para as escamas de peixes, no momento não há nenhuma utilização comercial para estas, impedindo o direcionamento ou destinação adequada do grande volume de escamas produzidos pela piscicultura nacional (HUANG; HSIAO; CHAI, 2011; MARTINS *et al.*, 2015).

As escamas possuem componentes orgânicos e inorgânicos que podem ser aproveitados, principalmente apatitas e colágeno, os quais possuem valor comercial para utilização na produção de alimentos, fármacos, cosméticos e biomateriais (HUANG; HSIAO; CHAI, 2011).

Neste contexto, este trabalho busca apresentar uma revisão de literatura sobre as etapas e métodos de obtenção de colágeno e apatitas a partir de

escamas de peixe, realizando um levantamento das principais tecnologias disponíveis para o aproveitamento e valorização deste material.

2 JUSTIFICATIVA

Nas últimas décadas, tem-se discutido como a sociedade vem explorando e usando os recursos naturais, e como consequência o interesse por tecnologias que busquem a remediação de resíduos e resultem na obtenção de produtos de alto valor aumentou, resultando em uma valorização dos resíduos (BASTIDAS-OYANEDEL; SCHMIDT, 2019). Nesse contexto, encontram-se os resíduos do processamento de peixes, que surgem como matéria-prima alternativa para obtenção de produtos de interesse comercial.

Dentre os constituintes minerais das escamas de peixe, destacam-se as apatitas (minerais ricos em cálcio e fosfatos) dentre as quais, geralmente, as hidroxiapatitas (HAp) se encontram em maior quantidade. Tais compostos minerais, quando purificados possuem várias aplicações comerciais, sendo sua aplicação em enxertos ósseos, a possibilidade de mais nobre potencial econômico, por sua similaridade à composição óssea humana. A obtenção das apatitas a partir das escamas de peixes é um processo alternativo à síntese e que tem demonstrado grande potencial e aplicabilidade (HUANG; CHU, 2013).

Além da fração inorgânica, as escamas de peixes também possuem em sua composição uma fração orgânica, a qual é majoritariamente composta por colágeno. O colágeno é uma proteína muito utilizada em aplicações cosméticas, biomédicas e farmacêuticas. As maiores fontes de colágeno no Brasil são provenientes de subprodutos do processamento de carnes, porém existem problemas relacionados a questões religiosas (por exemplo, judeus e muçulmanos não consomem produtos de origem suína e hindus não consomem produtos de origem bovina) e de segurança (possibilidade de surtos de encefalopatia espongiforme bovina e febre aftosa). Nesse contexto, sendo as escamas de peixe ricas em colágeno, estas demonstram um elevado potencial como fonte alternativa para a obtenção deste recurso, dado seu caráter residual (OGAWA *et al.*, 2003; SILVA; PENNA, 2012).

3 OBJETIVOS

3.1 Gerais

O objetivo do presente trabalho é apresentar uma revisão bibliográfica sobre os métodos de obtenção de compostos de alto valor agregado (colágeno e apatitas) a partir de escamas de peixe.

3.2 Específicos

- Facilitar o acesso de dados publicados nos últimos anos (estado da arte) sobre a obtenção de colágeno e apatitas de escamas de peixe.
- Descrever os principais processos ou rotas de obtenção e purificação de colágeno e apatitas a partir de escamas de peixe.
- Apresentar as técnicas de caracterização de colágeno e apatitas que permitem avaliar as propriedades (físico-químicas, estruturais e morfológicas) e qualidade dos materiais obtidos.
- Descrever as propriedades e aplicações do colágeno e apatitas obtidos a partir de escamas de peixe.

4 METODOLOGIA

Esta revisão foi realizada por meio de consultas a artigos científicos, livros, dissertações e teses que abordam a obtenção de colágeno e apatitas a partir de resíduos do processamento de peixes, com foco especialmente nas escamas. Foram realizadas consultas dos periódicos nos portais *Science Direct*, Periódicos CAPES, SCIELO e Google Scholar. O material se concentrou em publicações do período de 2008 a 2021, relacionado aos seguintes tópicos: (i) aproveitamento de resíduos, (ii) biorrefinaria, (iii) utilização de resíduos do processamento de peixes, (iv) escamas de peixe, (v) colágeno, (vi) apatitas, (vii) métodos de obtenção, purificação e caracterização, (viii) aplicações do colágeno e (ix) aplicações das hidroxiapatitas.

5 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Este estudo será organizado da seguinte maneira: inicialmente serão abordadas seções sobre o aproveitamento de resíduos agroindustriais, conceito de biorrefinaria e o cenário da produção de pescados e seus resíduos. Em seguida será apresentada uma revisão sobre a estrutura das escamas de peixe, do colágeno e das apatitas. Em sequência, serão descritas as aplicações do colágeno e das apatitas, os principais métodos de obtenção do colágeno e das apatitas a partir de escamas de peixes. Por fim, serão descritas as técnicas de caracterização dos biomateriais e as lacunas e oportunidades de pesquisa identificadas.

5.1 Aproveitamento de resíduos agroindustriais

O aumento da população mundial nos últimos anos provocou a intensificação nas atividades agropecuárias, e com isso um aumento da geração de resíduos. Estes resíduos estão associados ao desperdício no uso de insumos, perdas entre a produção e o consumo, e aos materiais que não apresentam valor econômico evidente (ROSA *et al.*, 2011).

De acordo com o Programa das Nações Unidas para o Meio Ambiente (UNEP), a geração global de resíduos de origem agrícola e do seu processamento, é na ordem de 140 bilhões de toneladas ao ano, resíduos estes que se constituem de caules, palhas, folhas, raízes, cascas, resíduos de madeira e resíduos da criação de animais (UNEP, 2015).

Destes resíduos, toneladas são desperdiçados, sendo destinados a aterros sanitários ou dispostos em locais inapropriados, sem tratamento adequado. Dentre os problemas associados da má destinação da biomassa se encontram poluição atmosférica, contaminação de águas superficiais e subterrâneas, entre outros (COLEN *et al.*, 2019).

Possíveis utilizações para essas biomassas vêm sendo estudadas, pois permitem associar a proteção ambiental com o desenvolvimento econômico,

pela redução custos e perdas produtivas, e também pela criação de novas fontes de receita, pela inserção de novos produtos no mercado.

5.2 Conceito de Biorrefinaria

De acordo com o Departamento de Energia dos Estados Unidos (DOE), biorrefinaria é definida como uma planta de processamento onde fontes de biomassa são extraídas e convertidas em um espectro de produtos com valor de mercado. Do ponto de vista da sustentabilidade, o conceito de biorrefinaria visa alcançar a redução da geração de resíduos e a economia circular, utilizando os resíduos como matérias-primas (MAITY, 2015; BASTIDAS-OYANEDEL; SCHMIDT, 2019).

Biomassa, por sua vez, pode ser compreendida como qualquer matéria orgânica disponível de forma renovável ou recorrente, como por exemplo resíduos agrícolas, dejetos animais, culturas energéticas, resíduos florestais, industriais e urbanos (MAITY, 2015).

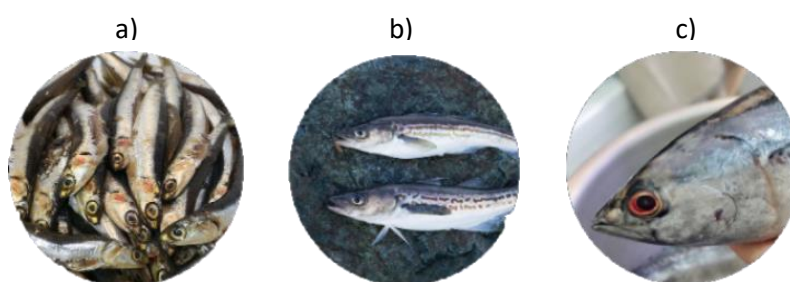
O desenvolvimento e implementação de processos de biorrefinaria é considerado a chave para o estabelecimento de uma sociedade sustentável. Espera-se que a biomassa se torne um dos principais recursos renováveis para a produção de alimentos, ração animal, materiais, combustíveis, produtos químicos, energia e calor. Para concretizar essa visão, é necessária a implementação de um conjunto de medidas, como o uso da biomassa da forma mais eficiente possível e com menor impacto ambiental, redução do consumo de energia, redução de custos de fabricação, diminuição da pegada de CO₂ e redefinição das rotas de transformação (ARESTA; DIBENEDETTO; DUMEIGNIL, 2012).

5.3 Cenário da produção de pescados e seus resíduos

O setor de pesca e aquicultura expandiu-se expressivamente nas últimas décadas e a produção global atingiu um recorde histórico em 2018, sendo

estimada em 179 milhões de toneladas (FAO, 2020). A produção mundial de pesca de captura foi de 96,4 milhões de toneladas, com o ranking (em ordem decrescente) dado por: China, Indonésia, Peru, Índia, Rússia, Estados Unidos e Vietnã. Em termos de espécies, a principal captura foi de anchoveta (*Engraulis ringens*, Figura 1 a), seguida pelo Alaska pollock (*Theragra chalcogramma*, Figura 1 b) e o atum gaiado (*Katsuwonus pelamis*, Figura 1 c) (FAO, 2020).

Figura 1 - Espécies de peixes de captura mais populares.



a) Anchoveta. b) Alaska pollock. c) Atum gaiado.

Fonte: Adaptado de Fao (2020).

No ano de 2018, a produção mundial de peixes de criação foi dada por 54,4 milhões de toneladas, em que 47 milhões de toneladas correspondem a espécies de peixe de água doce e 7,3 milhões de toneladas de espécies de peixes marinhos (FOGAÇA, 2020). Os principais países produtores de peixes de cultivo são China, Índia, Indonésia, Vietnã, Bangladesh, Egito, Noruega e Chile (FAO, 2020). Segundo o levantamento da FAO (2020), o peixe de cultivo mais produzido a nível mundial no ano de 2018 foi a carpa-capim (*Ctenopharyngodon idellus*, Figura 2 a) seguida da carpa prateada (*Hypophthalmichthys molitrix*, Figura 2 b) e da tilápia do nilo (*Oreochromis niloticus*, Figura 2 c).

De acordo com a Associação Brasileira da Piscicultura (PEIXEBR, 2019), o Brasil produziu 722.560 toneladas de peixes de cultivo em 2018, sendo 400.280 toneladas somente de Tilápia. Assim o Brasil assumiu a 4ª posição de maior produtor de Tilápia do mundo, atrás da China, Indonésia e Egito.

Figura 2 – Espécies de peixes de cultivo mais produzidas.



a) Carpa-capim. b) Carpa prateada. c) Tilápia do Nilo.

Fonte: Adaptado de Globo Rural (2019).

O Paraná é o estado com maior produção de peixes de cultivo do Brasil, em 2018 produziu 129.900 toneladas, apresentando um crescimento de 16% (PEIXEBR, 2019). A produção de peixes se concentra no oeste do estado, sendo que as microregiões de Toledo e Cascavel participam de aproximadamente 50% da produção estadual (EMATER, 2012).

A intensificação da atividade pesqueira e da aquicultura resulta em um aumento na produção de resíduos, constituídos principalmente de ossos, vísceras, barbatanas, pele e escamas. Devido à natureza orgânica e inorgânica desses materiais, se não for realizada a destinação apropriada, podem se tornar causadores de impactos ambientais (FELTES *et al.*, 2010). Além disso, a não utilização deste material pode ser considerada um desperdício de recursos, pois as escamas possuem componentes de interesse comercial e sua recuperação apresenta um potencial econômico a ser explorado.

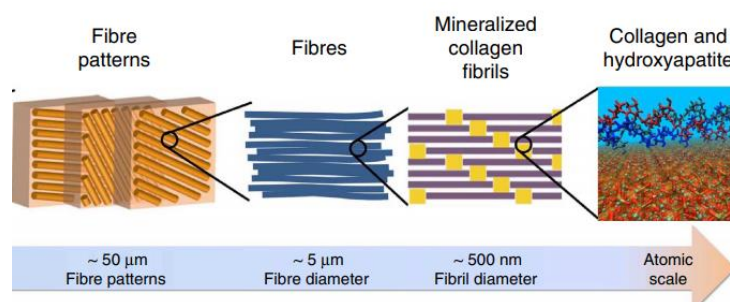
Segundo a FAO (2020) cerca de 35% da produção global de pescados é perdida ou desperdiçada. As escamas compõem cerca 4% dos resíduos gerados na indústria de processamento de peixes, sendo que muitas vezes não são reconhecidas como matéria-prima e fonte para outros produtos. Apesar disso, existem algumas aplicações para as escamas, ainda que bastante específicas, como por exemplo o seu uso como adsorvente natural para remoção de metais pesados e pigmentos de águas residuais. Porém, tais aplicações são insuficientes para direcionar o aproveitamento integral do grande volume de escamas produzidos pela piscicultura (HUANG; HSIAO; CHAI, 2011; MARTINS *et al.*, 2015).

As escamas de peixe possuem componentes orgânicos e inorgânicos que podem ser aproveitados, principalmente colágeno e apatitas (sendo encontrados aproximadamente em uma proporção de 1:1) os quais possuem diversas aplicações nas áreas de alimentos, farmácia, cosméticos, tratamento de efluentes, biomedicina e odontologia.

5.4 Escamas de peixe

Nesta seção será apresentada uma breve revisão sobre as principais características das escamas, suas microestruturas e propriedades. As escamas são placas sólidas que se encontram presas à pele dos peixes, formadas por um tecido ósseo composto por fibrilas de colágeno de tipo I, que formam uma matriz onde se depositam cristais de hidroxiapatita (Figura 3). As interações entre essas moléculas, possuem um papel significativo no fornecimento de flexibilidade, força e resistência, conferindo proteção ao animal sem dificultar a sua movimentação. Nas escamas, as fibrilas de colágeno crescem de forma alinhadas e compactadas dando origem aos anéis de crescimento (Figura 4). Além disso, as escamas possuem diversas camadas e a direção das fibrilas se difere em cada uma destas (HUANG *et al.*, 2015; SANTOS *et al.*, 2009; QIN *et al.*, 2021).

Figura 3 – Matriz de colágeno-apatitas em tecidos ósseos.

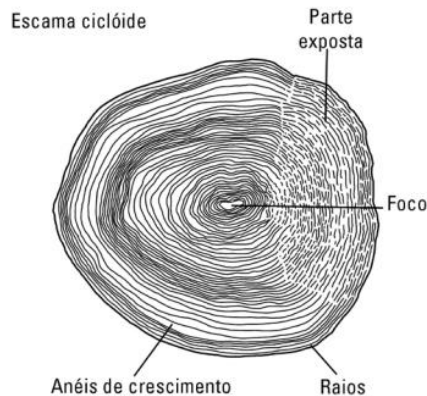


Fonte: Nair *et al.* (2013).

As escamas de peixes são formadas por uma matriz com composição média de 49,7% de fração inorgânica e 50,3% de fração orgânica (VILLANUEVA-ESPINOSA; HERNÁNDEZ-ESPARZA; RUIZ-TREVIÑO, 2001). De acordo com

Santos (2016), 98% da composição mineral das escamas de tilápia é constituída de hidroxiapatitas.

Figura 4 - Escama de tilápia.



Fonte: Adaptado de Walker e Liem (1994).

De acordo com Contreras-Guzmán (1994) diversos fatores influenciam a composição química dos tecidos dos peixes, sendo alguns de natureza inerente, tais como fatores genéticos, morfológicos e fisiológicos; e fatores exógenos, tais como clima, estação do ano e alimentação. Porém as escamas das distintas espécies de peixes apresentam poucas diferenças, sendo elas geralmente na organização das fibras e nas quantidades e tipos de minerais.

5.5 Composição das escamas de peixe

Para uma maior compreensão sobre o tecido que forma as escamas é necessário um entendimento sobre cada um dos seus blocos de construção, assim, será apresentado a seguir uma revisão sobre o colágeno e sobre as apatitas.

5.5.1 Fração orgânica: Colágeno

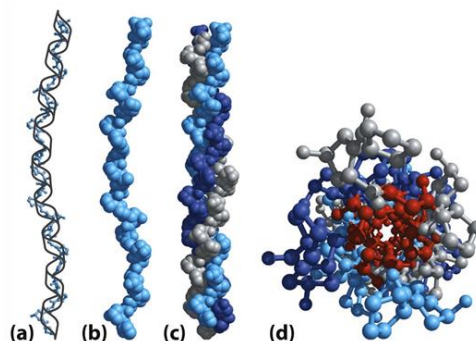
O colágeno é classificado com uma família de pelo menos 27 proteínas isomorfas encontradas principalmente em ossos, pele e tecidos conectivos de

animais. Sua estrutura fibrilar possui cerca de 3.000 Å de comprimento e 15 Å de largura (NELSON; COX, 2004; DAMODARAN; PARKIN; FENNEMA, 2010).

A característica mais expressiva do colágeno é que a sua sequência de aminoácidos é composta pela repetição de uma unidade tripeptídica, Glicina-X-Y, em que X normalmente é uma prolina e Y geralmente é uma 4-hidroxiprolina. Em geral, os colágenos contêm cerca de 33% de glicina, 12% de prolina, 11% de alanina e 10% de hidroxiprolina (DAMODARAN; PARKIN; FENNEMA, 2010; NELSON; COX, 2004).

A unidade básica do colágeno é denominada tropocolágeno, formado por três polipeptídios separados, chamados de cadeias α , que são supertorcidos uns sobre os outros, como mostra a Figura 5. As cadeias α podem ser idênticas ou podem apresentar diferenças na sequência de aminoácidos, dependendo do tipo de colágeno. A tripla hélice é estabilizada por ligações de hidrogênio intercadeias e sua torção super-helicoidal tem sentido horário, oposto ao das cadeias α (DAMODARAN; PARKIN; FENNEMA, 2010; NELSON; COX, 2004).

Figura 5 – Estrutura do colágeno.



a) Cadeia α . b) Modelo de volume atômico da mesma cadeia α . c) Tropocolágeno d) Tropocolágeno mostrado por uma das extremidades no modelo de esfera e bastão.

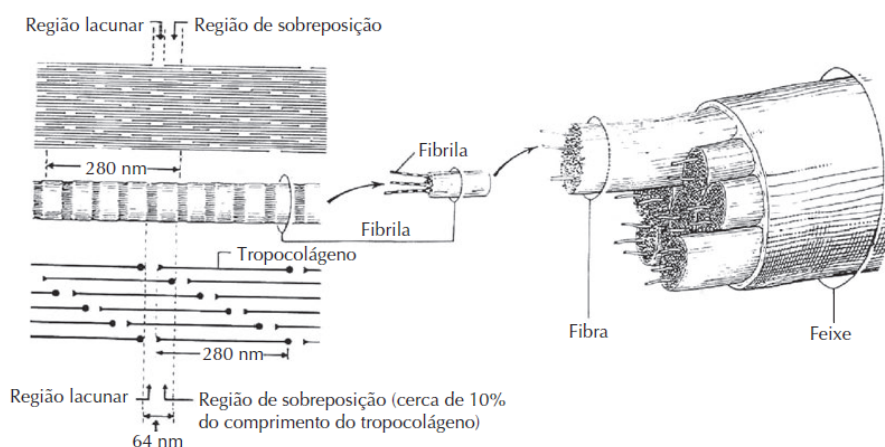
Fonte: Nelson e Cox (2004).

Os resíduos de glicina são acomodados nas junções entre as cadeias α individuais (mostrados na Figura 5 d, em vermelho). Os resíduos de 4-hidroxiprolina e prolina são responsáveis pela torção acentuada da hélice. A sequência de aminoácidos e a estrutura quaternária supertorcida fazem com que a compactação seja muito eficiente e promove uma alta resistência elástica (NELSON; COX, 2004).

O colágeno é tipicamente insolúvel em água, pois possui aminoácidos hidrofóbicos em seu interior e em sua superfície, por esse motivo possui tendência de formar complexos supramoleculares elaborados. As fibrilas de colágeno são formadas pela associação (*crosslinking*) de tropocolágeno, garantindo diferentes graus de resistência elástica dependendo da maneira que é feita a sua sobreposição. As unidades de tropocolágeno se organizam em arranjos de conformação torsa, lado a lado, com sobreposição cabeça-cauda, o que gera regiões com lacunas e com sobreposição (Figura 6). O conjunto de fibrilas forma as fibras de colágeno, que se organizam em feixes (DAMODARAN; PARKIN; FENNEMA, 2010; NELSON; COX, 2004).

Os colágenos formadores de fibrilas ou fibrilares contêm sequências longas e ininterruptas (Gly-X-Y). Eles estão entre as proteínas mais abundantes na natureza, e os mais abundantes dos colágenos fibrilares são referidos como tipos I, II e III (AN; LIN; BRODSKY, 2016).

Figura 6 - Estrutura das fibrilas de colágeno.



Fonte: Damodaran, Parkin e Fennema (2010).

O colágeno do tipo I é o mais comumente encontrado, ele constitui cerca de 50% do peso seco de ossos, ligamentos e tendões desmineralizados. Sua estrutura terciária é composta por um heterotrímero, ou seja duas cadeias idênticas $\alpha 1(I)$ e uma cadeia com uma sequência diferente de aminoácidos denominada de $\alpha 2(I)$ (AN; LIN; BRODSKY, 2016).

Os colágenos do tipo II e III possuem estruturas similares ao colágeno do tipo I, mas são homotrímeros, ou seja, possuem três cadeias iguais ($\alpha 1(\text{II})$ e $\alpha 1(\text{III})$, respectivamente). O colágeno do tipo II encontra-se principalmente em cartilagens, onde forma fibrilas finas que prendem proteoglicanos carregados e água, resultando em uma estrutura em formato de arco que torna a cartilagem altamente resistente à compressão. O colágeno tipo III está presente em muitos tecidos associado a pequenas quantidades do colágeno do tipo I, e é particularmente abundante na aorta (DAMODARAN; PARKIN; FENNEMA, 2010; PROCKOP, 2013).

Dentro da família dos colágenos, existe uma parcela que não forma estruturas complexas, estes são denominados colágenos não fibrilares. As proteínas desse grupo possuem sequências curtas de Glicina-X-Y ou sequências de Glicina-X-Y que são interrompidas por sequências não colágenas. Como um resultado disso, as proteínas não se agrupam em fibrilas altamente ordenadas (PROCKOP, 2013).

Um exemplo importante de um colágeno não fibrilar é o tipo IV, que é um constituinte abundante das membranas basais. Ele é composto por sequências Glicina-X-Y interrompidas por sequências não colágenas e possui grandes domínios globulares nas extremidades. Essas características permitem a formação de redes flexíveis que ligam várias outras proteínas. As redes flexíveis ligam as células epiteliais e formam as barreiras que protegem o organismo do ambiente externo (PROCKOP, 2013).

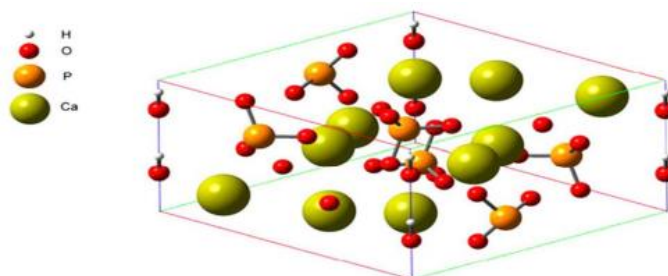
5.5.2 Fração mineral: Apatitas

A outra fração presente em grandes quantidades nas escamas de peixe são as apatitas, que são minerais da família dos fosfatos de cálcio e possuem fórmula $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6\text{X}_2$, em que X pode ser substituído pelo íon F^- (flúor-apatita), o íon OH^- (hidroxiapatita) ou íon Cl^- (cloroapatita) (ELLIOT, 1994).

As hidroxiapatitas (HAp) cristalizam em um arranjo hexagonal, contendo 10 íons de cálcio, caracterizado por uma simetria perpendicular em três eixos formando ângulos de 120° (SANTOS, 2016), como apresentado na Figura 7.

As HAp biológicas possuem algum grau de substituição de grupos fosfato (PO_4^{3-}) por carbonato (CO_3^{2-}), hidróxido (OH^-) por flúor (F^-), e cálcio (Ca^{2+}) por sódio (Na^+) e magnésio (Mg^{2+}) (DUMINIS; SHAHID; HILL, 2017).

Figura 7 - Representação esquemática de uma célula unitária de hidroxiapatita.



Fonte: Ménéndez-Proupin *et al.* (2011).

As HAp podem ser sintetizadas por diversas técnicas, como precipitação, sol-gel, hidrotermal, emulsões múltiplas, deposição biomimética e técnicas de eletrodeposição (NAYAK, 2010). Hidroxiapatitas sintéticas tem sido empregadas em diversas aplicações como substituição óssea, cimentos dentais, porcelanas dentais (DUMINIS; SHAHID; HILL, 2017). No entanto, os processos de síntese podem ser complicados ou biologicamente inseguros, por isso recentemente tem-se buscado extrair biocerâmicas de HAp a partir de matriz óssea de subprodutos industriais, que também se demonstra economicamente e ambientalmente preferível (BARAKAT *et al.*, 2009).

As hidroxiapatitas (HAp) são encontradas naturalmente em tecidos ósseos incorporadas em uma matriz de colágeno, e vem sendo intensamente empregadas com biomaterial para uso em enxertos ósseos (ELLIOT, 1994; APPLEFORD *et al.*, 2009). HAp naturais são encontradas em cascas de ovos, ossos animais, dentes animais, conchas, corais e escamas (HUANG; CHU, 2013; KONGSRI *et al.*, 2013).

Uma característica importante das hidroxiapatitas é a sua relação Ca/P, em que o valor de 1,67 caracteriza a composição estequiométrica da HAp (SIDDHARTHAN; SESHADRI; SAMPATH KUMAR, 2004). As apatitas naturais são não estequiométricas e possuem, além dos componentes principais, a presença de elementos traço como sódio, ferro, flúor, magnésio, potássio, zinco

e outros. Estes elementos influenciam na biocompatibilidade e performance como material em implantes, uma vez que também estão presentes nos ossos humanos. No entanto, o aumento desses componentes resulta na redução da proporção Ca/P (SAMAVEDI; WHITTINGTON; GOLDSTEIN, 2013; TERZIOĞLU; ÖĞÜT; KALEMTAŞ, 2018).

5.6 Aplicações dos constituintes das escamas

Nas próximas seções serão exploradas as possíveis aplicações do colágeno e das apatitas obtidos de subprodutos de peixe, com o intuito de melhor compreender quais são suas propriedades e em quais áreas a sua utilização é mais promissora.

5.6.1 Aplicações do colágeno

As aplicações do colágeno de peixes em diferentes áreas ainda estão sendo descobertas, isso porque ainda não se tem conhecimento aprofundado de todas as suas propriedades. A seguir serão apresentadas algumas das possíveis aplicações do colágeno obtido de escamas de peixe.

A presença de grandes quantidades de aminoácidos como glicina, prolina, hidroxiprolina, alanina, e a ausência da maioria dos aminoácidos essenciais como o triptofano, faz com que o colágeno seja considerado uma fonte proteica pobre para a dieta humana (NELSON; COX, 2004). No entanto, os peptídeos de colágeno podem ser utilizados como suplemento alimentar, proporcionando alguns efeitos benéficos para o corpo, como aumento da densidade óssea em pessoas que sofrem de desnutrição ou doenças articulares degenerativas (CHAI *et al.*, 2010).

Huang *et al.* (2015) demonstrou a atividade de ligação do Fe(II) à peptídeos de colágeno obtidos pela hidrólise enzimática de escamas de peixe, resultado este que pode ser interessante na área de suplementação nutricional,

pois os sais de ferro reagem com alguns componentes alimentares, diminuindo sua biodisponibilidade.

Os peptídeos obtidos a partir da hidrólise de colágeno, dependendo da sua massa molecular, podem apresentar propriedades biológicas diferentes, como clareamento de pele, antioxidante, diminuição da pressão arterial e aumento da densidade óssea (FERRARO *et al.*, 2013; HUANG *et al.*, 2016). No estudo de Chai *et al.* (2010) peptídeos de colágeno de escamas de tilápia foram preparados usando uma combinação de proteases, e testes *in vivo* demonstraram que estes peptídeos foram capazes de penetrar na epiderme e derme, podendo assim ativar fibroblastos e acelerar a síntese de colágeno.

O colágeno derivado de espécies de peixes de água quente, incluindo tilápia, apresenta características semelhantes ao colágeno obtido de mamíferos, sugerindo que possa ser utilizado como uma alternativa em aplicações biomédicas (LIM *et al.*, 2019).

Ao ser utilizado como matéria-prima para biomateriais, o colágeno apresenta propriedades favoráveis, como baixa toxicidade, baixa resposta imunológica, habilidade de promover o crescimento celular e reconstrução da estrutura microfibrilar encontrada nos tecidos (LEE; SINGLA; LEE, 2001). Segundo Pires, Bierhalz e Moraes (2015) o colágeno interage favoravelmente com as células através de domínios específicos de reconhecimento presentes na estrutura celular, podendo ser utilizado na área biomédica, como veículo para fármacos, genes e proteínas. Além disso, Subhan *et al.* (2020) afirma que membranas de colágeno de peixe possuem elevada porosidade e estrutura de poros interconectados, capacidade de permitir a passagem de nutrientes e oxigênio e alta estabilidade.

O colágeno obtido de escamas de peixes também vem sendo estudado como substituto para pele humana, vasos sanguíneos e ligamentos (LEE, C.; SINGLA; LEE, Y, 2001). O estudo de Pal *et al.* (2016) demonstrou o potencial do colágeno extraído de escama de peixe como um substituto para a pele humana e tratamento de queimaduras e feridas. O material desenvolvido a partir do colágeno aumentou a taxa de cicatrização de feridas, reepitelização e reconstituição dérmica *in vivo*. O colágeno de escamas de peixe também possui

propriedades que estimulam a condrogênese (formação de cartilagem). O estudo de Hsu *et al.* (2016) demonstrou isto utilizando células-tronco mesenquimais humanas (hMSCs - *human mesenchymal stem cells*).

Além de todas estas aplicações mais específicas, o colágeno também é amplamente empregado na indústria alimentícia pois proporciona consistência, estabilidade e elasticidade aos alimentos (HUANG *et al.*, 2016). O colágeno desnaturado, também conhecido como gelatina, é solúvel em água e possui diversas aplicações na área alimentícia, farmacêutica e cosmética (OGAWA *et al.*, 2003).

Desta forma, verifica-se que as principais aplicações do colágeno envolvem as áreas:

- Biomédica;
- Cosmética;
- Farmacêutica;
- Suplementação Alimentar.

Ainda que muitas das aplicações do colágeno obtido de resíduos de peixes se encontrem no estágio de testes e pesquisa, os estudos demonstram um futuro promissor, com tecnologias com grande aplicabilidade comercial.

5.6.2 Aplicações das Apatitas

Na literatura são reportados muitos trabalhos explorando o emprego das hidroxiapatitas (HAp) em aplicações ortopédicas e odontológicas, porém muitas outras aplicações médicas vêm sendo estudadas, pois as HAp possuem propriedades bioativas, osteocondutoras, osteoindutoras, são biocompatíveis, não tóxicas, não inflamatórias e não imunogênicas (ELLIOT, 1994; APPLEFORD *et al.*, 2009; PON-ON *et al.*, 2016).

No estudo de Lee *et al.* (2010) foi avaliada a diferenciação de células-tronco mesenquimais humanas (hMSCs) em *scaffolds*¹ com e sem HAp. Foi possível concluir que houve um aumento da expressão de genes osteogênicos com o aumento do conteúdo de HAp, indicando um efeito osteoindutor positivo da concentração de HAp.

Huang, Hsiao e Chai (2011) demonstraram que o uso de hidroxiapatitas obtidas a partir de hidrólise enzimática de escamas de peixe promove um aumento no crescimento de células MG-63 (células de osteossarcoma humano), e foi capaz de promover diferenciação osteogênica e mineralização das células MG-63.

Além disso, muitos pesquisadores utilizam as hidroxiapatitas extraídas de escamas de peixes com outros materiais poliméricos para aplicações como *scaffolds*. Huang e Chu (2013) desenvolveram uma membrana composta por quitosana, gelatina e hidroxiapatitas sinterizadas obtidas por hidrólise enzimática de escamas de peixe, a qual apresentou um potencial de crescimento de células MG-63 maior do que a mesma membrana contendo hidroxiapatitas comerciais.

As hidroxiapatitas possuem várias aplicações na área odontológica, como na reparação do esmalte, regeneração do tecido ósseo e regeneração do tecido periodontal. O estudo de Devitasari, Hudiyati e Anastasia (2019) avaliou o efeito da aplicação de hidroxiapatitas obtidas de resíduos ósseos de tilápia na dureza do esmalte dental. De acordo com os autores a pasta dental aplicada aumentou a dureza da superfície do esmalte.

Diversos estudos vêm demonstrando a capacidade de adsorção de hidroxiapatitas, sendo utilizadas no tratamento de águas residuais e remoção de metais pesados em solução (KONGSRI *et al.*, 2013). No estudo de Liaw *et al.* (2020) foram produzidas estruturas compostas de hidroxiapatita (extraídas de escamas de peixe)/quitosana, o material produzido demonstrou grande capacidade de remover íons de metais pesados de águas residuais. Ainda, Sricharoen *et al.* (2020) demonstraram que HAP preparadas a partir de escamas de tilápia possuem a capacidade de remover Hg²⁺ de soluções aquosas.

¹ *Scaffolds* são estruturas tridimensionais porosas utilizadas na engenharia de tecidos como suporte, promovendo a proliferação celular ou colonização de células (BERNARDES, 2016).

Os resultados apresentados nesta seção indicam claramente que hidroxiapatitas com boa biocompatibilidade podem ser extraídos de resíduos de peixes, e devido às suas características biológicas e físico-químicas, existe um enorme potencial de desenvolvimento de tecnologias, principalmente nas áreas biomédicas, odontológicas, tratamento de efluentes e biomateriais. O mercado atual está exigindo fontes de obtenção de apatitas confiáveis e menos caras, e os subprodutos de pescado se encaixam nesse perfil.

5.7 Métodos de obtenção dos compostos

Nas próximas seções serão descritas as principais tecnologias disponíveis para a obtenção de colágeno e apatitas a partir de escamas de peixes.

5.7.1 Extração de colágeno

O isolamento e caracterização do colágeno de resíduos de peixe tem se mostrado como uma tendência de pesquisa. A Tabela 1 apresenta um compilado de trabalhos realizados recentemente nesta área, contendo as principais metodologias utilizadas, bem como suas potenciais aplicações.

A partir dos dados obtidos com a Tabela 1 foi elaborado um fluxograma (Figura 8), que apresenta as etapas de um processo típico de obtenção de colágeno a partir de escamas de peixe, sendo elas: pré-tratamento, extração, purificação e caracterização. Verifica-se que os principais métodos de pré-tratamento envolvem tratamentos ácidos, básicos ou com EDTA, sendo que alguns trabalhos empregam concomitantemente um tratamento térmico. Em relação aos métodos de extração, destacam-se a hidrólise química e enzimática, além de que alguns outros métodos vêm sendo empregados como a adição de ultrassom aos métodos anteriores citados, combinação de hidrólise ácida e enzimática, extração salina e processo hidrotérmico. Com relação aos métodos de purificação do colágeno de escamas de peixe, o mais empregado utiliza da

combinação entre precipitação e diálise, podendo ainda ser empregada a técnica de ultrafiltração hidrofílica. Quanto as caracterizações, as mais empregadas são eletroforese em gel de dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE), espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier (FTIR) e cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC). Nas próximas seções será abordado com mais detalhes cada uma destas etapas.

Tabela 1 - Trabalhos referentes à obtenção de colágeno a partir de resíduos do processamento de peixes.

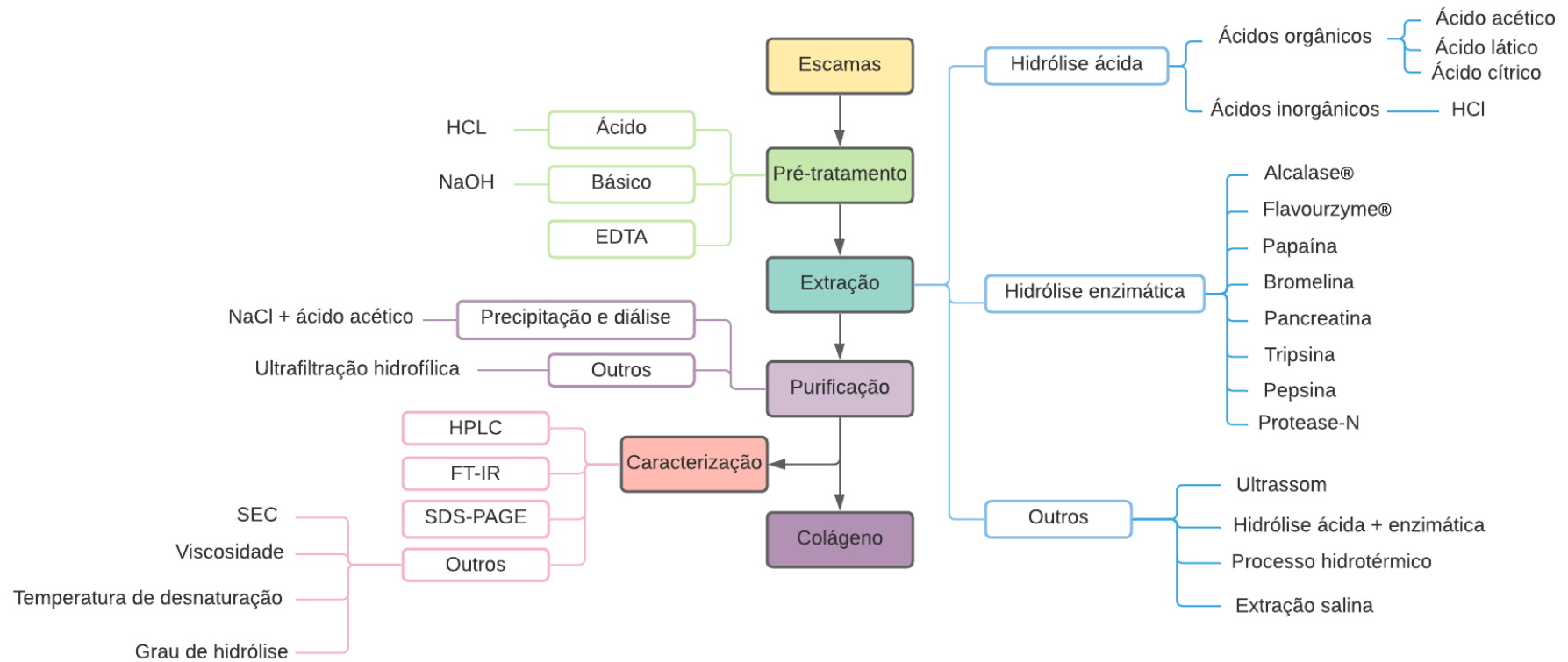
Material	Pré-tratamento	Método de extração	Purificação	Análises	Rendimento (?)	Aplicação	Referência
Escama de tilápia (<i>Oreochromis niloticus</i>).	Lavagem e secagem.	Extração hidrotermal: 80°C por 8 h. Hidrólise enzimática: Alcalase 2.4 L nas concentrações de 0,5; 1,0; 1,5; 2% (m/m), por 1 h em 55°C.	-	SEC, grau de hidrólise, FTIR, viscosidade, HPLC.	-	Potencial aplicação cosmética.	Izzati, Zainol e Hanim (2017).
Escamas de rohu (<i>Labeo rohita</i>) e Catla (<i>Catla catla</i>).	NaCl 1,0 mol/L, EDTA 20,0 mmol/L por 48 h. Seguido de EDTA 0,5 mol/L por 48 h.	Extração ácida: ácido acético 0,5 mol/L por 48 h.	Precipitação e diálise.	FTIR, SDS-PAGE, HPLC, mudança induzida da temperatura na viscosidade, dicroísmo circular.	5% (p/p)	Potencial aplicação farmacêutica e biomédica.	Pati, Adhikari e Dhara (2010).
Escamas de carpa (<i>Cyprinus carpio</i>).	Solução NaCl 10% (p) por 24 h. HCl 0,4 mol/L por 90 min.	Extração ácida: ácido acético 0,5 mol/L por 2 dias. Hidrólise enzimática: pepsina 0,5% (p/v) por 72 h.	Precipitação e diálise.	HPLC, SDS-PAGE, viscosidade, temperatura de desnaturação, DRX, UV-Vis.	-	Colágeno de fonte alternativa.	Zhang <i>et al.</i> (2011).
Escamas de Tilápia (<i>Oreochromis spp</i>), Perca-gigante (<i>Lates calcarifer</i>), curimã (<i>Mugil cephalus</i>) e peixe-leite (<i>Chanos chanos</i>).	Lavagem e secagem a 100°C por 2 h.	Hidrólise enzimática: Papaína e Flavourzyme® por 2 h e temperatura de 50°C.	-	SEC, quantificação de proteínas.	-	Suplementação alimentar.	Huang <i>et al.</i> (2015).

Tabela 1 (cont.) - Trabalhos referentes à obtenção de colágeno a partir de resíduos do processamento de peixes.

Escamas de Sardinha (<i>Sardinops melanostictus</i>), red sea bream (<i>Pagrus major</i>), robalo japonês (<i>Lateolabrax japonicus</i>).	NaOH 0,1 N por 3 dias.	Extração ácida: ácido acético 0,5 mol/L por 3 dias.	Precipitação.	SDS-PAGE, temperatura de desnaturação, HPLC.	50,9%; 37,5% e 41,0% respectivamente (base seca).	Colágeno de fonte alternativa.	Nagai, Izumi e Ishii (2004).
Pele, escama e ossos do peixe-vermelho (<i>Sebastes mentella</i>).	NaCl 1,0 mol/L por 24 h, EDTA 0,5 mol/L por 12 h.	Extração ácida: ácido acético 0,5 mol/L por 24 h.	Precipitação e diálise.	Viscosidade, temperatura de desnaturação, HPLC, SDS-PAGE, FTIR.	47,5%; 6,8% e 10,3% respectivamente.	Colágeno de fonte alternativa.	Wang <i>et al.</i> (2008).
Escamas de corvina (<i>Micropogonias furnieri</i>).	Lavagem e secagem a 110°C.	Extração ácida: avaliação de 3 protocolos.	Precipitação.	Grau de hidrólise, quantificação de proteínas, SDS-PAGE, Tricine-SDS-PAGE, FTIR, espectroscopia de massas.	Aproximadamente 21% nos 3 protocolos.	Biomateriais.	Bova (2016).
Escamas de Tilápia (<i>Oreochromis sp.</i>)	Lavagem e aquecimento a 121°C por 15 min.	Hidrólise enzimática: Protease N 1% por 2,5 h e Flavourzyme 0,5% por 30 min.	-	SEC	-	Aplicação cosmética.	Chai <i>et al.</i> (2010).

Fonte: Autoria própria (2021).

Figura 8 – Etapas da obtenção do colágeno.



Fonte: Autoria própria (2021).

5.7.1.1 Pré-tratamento

A realização de um pré-tratamento nas escamas tem como intuito de remover substâncias indesejáveis (e.g. gordura, sangue, minerais e outros) visando gerar maiores rendimentos no processo. Além disso, o pré-tratamento pode realizar a quebra das ligações cruzadas presentes no colágeno antes da extração (SCHMIDT *et al.*, 2016).

Dependendo da origem do material podem ser realizados pré-tratamentos diferentes, mas em todos os casos a matéria-prima deve ser obtida e mantida em condições higiênicas, deve ser processada rapidamente, ou mantida a temperaturas baixas (WANG *et al.*, 2008; PRESTES, 2013; RAMAKRISHNAN *et al.*, 2013). Além disso, a fragmentação do material é frequentemente realizada para facilitar as próximas etapas da obtenção de colágeno.

Para a realização do pré-tratamento podem ser empregados ácidos e bases diluídas, que irão realizar uma hidrólise parcial, por meio da clivagem das ligações cruzadas, mas mantendo as cadeias α do colágeno intactas. O pré-tratamento ácido, além de quebrar as ligações cruzadas, é realizado para retirada de minerais presentes no material, mas sua aplicação deve ser muito bem controlada para não causar desnaturação do colágeno. De acordo com Schmidt *et al.* (2016), o pré-tratamento ácido é mais adequado para matérias-primas frágeis com fibras de colágeno menos entrelaçadas.

Já o pré-tratamento alcalino, é utilizado para materiais mais espessos que requerem penetração mais agressiva dos agentes de tratamento, como ossos bovinos ou aparas (SCHMIDT *et al.*, 2016). Segundo Huang *et al.*, (2016) este pré-tratamento pode ser utilizado também para a remoção de proteínas não colagenosas. Para este método o agente mais comumente utilizado é o hidróxido de sódio.

Há também o método do ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA), que é bastante utilizado como pré-tratamento para escamas. Sua aplicação promove a desmineralização dos materiais e não resulta em perdas proteicas, mas pode

apresentar uma menor eficiência de remoção de minerais, se comparado com os outros métodos (SKIERKA; SADOWSKA; KARWOWSKA, 2007).

Existe a opção ainda, de não utilizar de nenhuma substância para a realização do pré-tratamento, realizando apenas lavagem com água, para remover substâncias indesejáveis e posteriormente secar o material.

Conforme apresentado, cada um dos métodos possui suas especificações, e cada um permite gerar materiais com propriedades distintas. Nos trabalhos analisados observou-se a falta da avaliação do efeito do pré-tratamento no rendimento geral do processo, que seria muito importante pois o grau de conversão de colágeno depende do pré-tratamento realizado juntamente com o processo de extração.

5.7.1.2 Métodos de extração do colágeno

Para a obtenção do colágeno a partir de materiais de origem biológica realiza-se a hidrólise proteica, que consiste na clivagem de proteínas em peptídeos de menor tamanho e, eventualmente em aminoácidos (SCHRIEBER; GAREIS, 2007). É necessário realizar uma hidrólise parcialmente controlada das ligações cruzadas e das ligações peptídicas da estrutura original do colágeno, para obter a distribuição ideal da massa molecular para determinada aplicação.

Este é um dos pontos cruciais de todo o processo de obtenção do colágeno, pois é a etapa que pode determinar o alcance de maiores rendimentos, maior pureza e integridade estrutural. Se tratando de escamas de peixe, a extração pode se dar principalmente pelo emprego de tratamentos químicos ou enzimáticos. A seguir serão apresentados os métodos mais empregados e suas características.

5.7.1.2.1 Hidrólise química

A hidrólise é a reação de um composto orgânico com a água, formando duas ou mais substâncias, por meio da clivagem de ligações químicas. Para realizar essa reação muitas vezes são utilizados catalisadores ácidos ou básicos (SPEIGHT, 2017).

A hidrólise ácida do colágeno pode ser realizada utilizando ácidos orgânicos como ácido acético, ácido cítrico e ácido lático, ou ácidos inorgânicos como ácido clorídrico. No entanto, os ácidos orgânicos solubilizam colágenos sem ligações cruzadas (*non-crosslinked colagens*) e quebram algumas das ligações cruzadas entre as cadeias, o que leva a uma maior solubilidade do colágeno durante o processo de extração, resultando em um maior rendimento (SCHMIDT *et al.*, 2016).

Soluções de ácidos orgânicos, especialmente ácido acético, são comumente utilizadas para extrair o colágeno. O material pré-tratado é adicionado à solução de ácido acético (geralmente 0,5 mol/L), e mantido por 24 a 72 h sob agitação constante a 4°C, dependendo da matéria-prima.

No trabalho de Wang *et al.* (2008) a extração do colágeno da pele, escama e ossos do peixe-vermelho (*Sebastes mentella*) foi realizada com solução de ácido acético 0,5 mol/L na proporção de 1:100 (p/v) com agitação por 24 h. O sobrenadante foi centrifugado a 20.000 g por 1 h e o resíduo foi reextraído e centrifugado nas mesmas condições. Todo o procedimento foi realizado na temperatura de 4°C. De acordo Wang *et al.* (2008) os colágenos obtidos foram essencialmente do tipo I e suas estruturas quaternárias apresentavam-se estáveis, podendo ser utilizado em futuras aplicações.

O processo alcalino de extração do colágeno é realizado utilizando uma solução básica, frequentemente hidróxido de sódio (NaOH), pelo período de alguns dias a semanas. Este processo é utilizado para materiais mais espessos que requerem uma penetração maior dos agentes de tratamento, como por exemplo ossos bovinos (SCHMIDT *et al.*, 2016). Considerando mais especificamente das escamas, as soluções básicas não são comumente utilizadas para a extração.

5.7.1.2.2 Hidrólise enzimática

Outro método de obtenção de colágeno que recebe destaque é a hidrólise enzimática. As enzimas são classificadas como proteínas complexas que reduzem a energia de ativação, promovendo um aumento da velocidade da reação. Esse aumento ocorre sem a modificação da constante de equilíbrio químico e com a regeneração da enzima no final da reação. As enzimas possuem elevada especificidade e atuam como catalisadores em diversas reações biológicas (NELSON; COX, 2004).

As enzimas proteases clivam as ligações peptídicas entre dois resíduos de aminoácidos adjacentes na sequência de uma proteína, resultando na diminuição da massa molecular, aumento do número de grupos ionizáveis e exposição de grupos hidrofóbicos que estavam protegidos na estrutura original da proteína (PANYAM; KILARA, 1996)

Os parâmetros mais importantes de uma reação da hidrólise enzimática são concentração de substrato (proteína), relação enzima/substrato, pH e temperatura, além da especificidade da enzima utilizada. O critério quantitativo da reação de proteólise é o grau de hidrólise, definido como a porcentagem de ligações peptídicas clivadas em relação ao total de ligações peptídicas (NIELSEN; OLSEN, 2002).

O emprego de enzimas proteolíticas para a hidrólise de resíduos de processamento de peixes é uma abordagem que tem sido muito utilizada nos trabalhos atuais. Algumas destas enzimas são: Alcalase® (IZZATI; ZAINOL; HANIM, 2017), Flavourzyme® (JENKELUNAS; LI-CHAN, 2018), papaína (HIMONIDES; TAYLOR; MORRIS, 2011), bromelina (HIMONIDES; TAYLOR; MORRIS, 2011), pancreatina (HIMONIDES; TAYLOR; MORRIS, 2011), tripsina (FERRARO *et al.*, 2013), pepsina (FERRARO *et al.*, 2013), protease-N (HUANG; HSIAO; CHAI, 2011), entre outras.

No estudo de Huang *et al.* (2015) foi realizada a hidrólise enzimática utilizando escamas de peixe. A mistura consistia das escamas trituradas, papaína, Flavourzyme, e tampão fosfato-salino (pH 7,0). A hidrólise foi conduzida a 50°C com agitação (200 rpm) por 2 h. A reação foi finalizada aquecendo a mistura em água fervente durante 10 min. O hidrolisado foi

posteriormente utilizado para avaliação da atividade de ligação ao Fe (II) para emprego em suplementos alimentares.

No estudo de Muzaifa, Safriani e Zakaria (2012), foi realizada a hidrólise enzimática de subprodutos de pescado (incluindo ossos, músculo escuro, vísceras, pele, escamas e outros) utilizando as enzimas Alcalase® 2.4L e Flavourzyme® 500L. O processo foi conduzido a aproximadamente 55°C com a adição de 2% de enzima, por 4 h. Após as caracterizações, os resultados entre as enzimas foram comparados. De acordo com os autores, o hidrolisado obtido a partir da enzima Alcalase apresentou maior teor de proteína, melhor solubilidade e propriedades emulsificantes.

Apesar da hidrólise química ser mais empregada em grandes escalas atualmente, processos que utilizam as enzimas são mais promissores quando são necessários produtos com alto valor nutricional e funcionalidade melhorada (SCHMIDT *et al.*, 2016). A hidrólise enzimática apresenta como principais vantagens sobre os outros métodos, o maior controle do grau de hidrólise, condições de reação mais brandas, alta especificidade da reação (sem geração de produtos secundários), além de ser uma técnica menos poluente que as demais. Porém apresenta custo elevado e é de difícil aplicação em escalas maiores (NOVOZYMES, 2016; LORENZETTI, 2018).

A obtenção de hidrolisados de proteína com faixas de massa molecular definidas e controladas, feitos sob medida para determinadas aplicações, estão em alta demanda, sendo este um dos maiores diferenciais que a hidrólise enzimática proporciona. Porém as tecnologias atuais utilizando enzimas para a obtenção de colágeno ainda precisam ser aperfeiçoadas, pois necessitam ser competitivas economicamente com os outros métodos.

5.7.1.2.3 Outros métodos

Alguns métodos alternativos estão sendo desenvolvidos e aprimorados para a obtenção do colágeno de escamas de peixe, buscando aproveitar todo o potencial da matéria-prima, melhorar as propriedades do material e aumentar os rendimentos.

Um dos métodos alternativos para a extração do colágeno é empregar ultrassom complementarmente aos processos anteriores citados. O ultrassom é amplamente utilizado para melhorar a transferência de massa em processos líquidos e o seu efeito é devido ao fenômeno de cavitação. As ondas ultrassônicas promovem a rápida formação de bolhas, que sofrem um colapso violento, resultando em temperaturas e pressões extremas (SCHMIDT *et al.*, 2016).

O ultrassom tem se demonstrado uma técnica vantajosa para extração do colágeno. No estudo de Kim *et al.* (2013), a extração de colágeno da pele de robalo japonês com ultrassom mostrou um aumento do rendimento e redução do tempo, sem prejudicar a qualidade do colágeno. Segundo Kim *et al.* (2013), o uso do ultrassom proporcionou um rendimento maior do que o método convencional de extração com ácido acético 0,5 mol/L, mesmo quando utilizado em baixa concentração de ácido (0,01 mol/L). Além disso, o aumento do tempo de extração e da amplitude do ultrassom proporcionaram um aumento no rendimento do colágeno.

Outro método alternativo é a combinação de extração ácida e enzimática. O trabalho de Chen *et al.* (2016) utilizou ácido acético 1,0 mol/L e pepsina 0,5% (p/p). Segundo os autores o processo utilizado no trabalho é bastante favorável pois remove telopeptídeos não helicoidais, que são determinantes antigênicos do colágeno, reduzindo o risco de rejeição imunológica para potenciais aplicações. O estudo de Zhang *et al.* (2011) utilizou um processo similar, com ácido acético 0,5 mol/L e pepsina 0,5% (p/v).

Outro método que vem sendo desenvolvido é a utilização de um processo hidrotérmico para a obtenção de peptídeos de colágeno. A técnica, que utiliza água em altas temperaturas e altas pressões, pode ser considerada ecologicamente correta e com um bom custo-benefício (apesar da demanda energética), pois é eficaz para a extração de bioativos, não é poluente, e é segura devido ao uso de água purificada como solvente (PARK; JO, 2019). No estudo de Izzati, Zainol e Hanim (2017) foi utilizada a extração hidrotérmica das escamas de tilápia, sendo realizada a 80°C por 8 h, seguida de hidrólise enzimática.

O trabalho de Liang *et al.* (2014) explorou a extração salina, que é um método potencialmente menos poluente que a hidrólise química. No estudo em questão, foi utilizado NaCl 0,45 mol/L na proporção de 1:100 (p/v). Os resultados indicaram que o colágeno obtido foi do tipo I, porém o rendimento obtido (2,18%) foi muito inferior a outros métodos.

Ainda existe muito a ser explorado sobre os métodos de obtenção de colágeno de peixes, e a busca por técnicas alternativas deve continuar a ser estudada, pois pode promover avanços na viabilidade dos processos. O desenvolvimento de uma abordagem eficaz que combina dois ou mais métodos pode ser a opção que explora de maneira mais eficiente a matéria-prima, aumentando os rendimentos e otimizando todo o processo.

5.7.1.3 Métodos de purificação do colágeno

O processo de purificação do colágeno se faz necessário para que este possa ser utilizado com maior segurança. Protocolos específicos podem ser utilizados dependendo da aplicação e das características desejadas no material. Frequentemente mais de uma etapa de purificação é necessária para atingir a pureza desejada.

5.7.1.3.1 Precipitação e diálise

É bastante comum em processos de purificação de proteínas utilizar métodos que exploram a solubilidade, que é uma função complexa do pH, temperatura, concentração de sais e outros fatores. O *salting-out* é um efeito em que altas concentrações de sal promove a redução da solubilidade de proteínas. A adição da quantidade correta de sal pode precipitar seletivamente algumas proteínas, enquanto outras permanecem em solução (NELSON; COX, 2004).

O processo clássico de *salting-out* utiliza os sais cloreto de sódio ou sulfato de amônio (NETTO, 2008). No entanto, nos trabalhos avaliados, o NaCl

tem sido amplamente empregado, pois é um sal conhecido por precipitar o colágeno e possui um valor relativamente baixo.

Foi observado que o *salting-out* é geralmente utilizado em conjunto com a diálise. A diálise é um procedimento de purificação de proteínas que utiliza como princípio a difusão e separação por tamanho. Nessa técnica o extrato a ser purificado é colocado em um saco ou tubo feito de uma membrana semipermeável, e essa membrana é suspensa em uma solução de grande volume. Nesse processo, a membrana irá reter as proteínas enquanto ocorre uma mudança na concentração de outros solutos (sais e outras substâncias indesejáveis de baixa massa molar), até que sua concentração atinja o equilíbrio com a solução externa à membrana (NELSON; COX, 2004; NETTO, 2008). Dependendo da aplicação do colágeno extraído, a membrana de diálise pode ser escolhida de acordo com a massa molecular de corte desejável.

No estudo de Pati, Adhikari e Dhara (2010) foi realizado o *salting-out*, adicionando NaCl na concentração de 0,9 mol/L e deixando repousar por 24 h. A suspensão foi centrifugada a 8000 rpm por 1 h e o precipitado foi resolubilizado em ácido acético. Os processos de *salting-out* e centrifugação foram repetidos 3 vezes. A solução final foi dialisada usando uma membrana de massa molecular de corte 12-14 kDa em ácido acético 0,1 mol/L por 24 h.

A precipitação em conjunto com a diálise, foi a técnica de purificação mais utilizada nos trabalhos avaliados, provavelmente por apresentar uma metodologia relativamente simples e barata. Apesar disso, a técnica obtém proteínas de baixa pureza (AWANG; AMID; ARSHAD, 2020). Desta forma, há então a necessidade pela busca de outros métodos de purificação, que permitam a obtenção de um colágeno com elevado grau de pureza para que possa ser utilizado em aplicações mais específicas e tecnológicas.

5.7.1.3.2 Outros métodos

Chen *et al.* (2016) desenvolveu um novo método de purificação do colágeno do tipo I utilizando ultrafiltração hidrofílica. O colágeno do tipo I, possuindo cerca de 300 kDa, foi retido com a ultrafiltração, facilitando a

separação de peptídeos de menores massas moleculares e sais inorgânicos. O resultado obtido foi de colágeno de tipo I com elevado nível de pureza eletroforética. O processo de apresentou vantagens sobre a combinação convencional de precipitação por sal e diálise, como: processo muito mais rápido, apresenta potencial de ser utilizado em escalas maiores e não necessita de etapas de purificação adicionais. Sua limitação está relacionada a possíveis danos ou entupimento da membrana.

5.7.2 Extração de apatitas

Na literatura pode-se encontrar diversos trabalhos que utilizam escamas como fonte de obtenção de HAp. Na Tabela 2 apresenta-se um compilado de trabalhos nesta linha de pesquisa, indicando os métodos utilizados e suas possíveis aplicações.

Diversas matérias-primas têm sido utilizadas como fontes obtenção de apatitas, para tanto, diversos protocolos vêm sendo desenvolvidos. A partir da Tabela 2, foi elaborado um fluxograma (Figura 9) exibindo as principais etapas de um processo de obtenção de apatitas a partir de escamas de peixe sendo elas: pré-tratamento, extração e caracterização. Verifica-se que o principal método de pré-tratamento é realizado com o emprego de ácidos, mas alguns estudos realizam também a fervura das escamas. Em relação aos métodos de extração, destacam-se a calcinação, hidrólise alcalina e hidrólise enzimática, sendo que alguns outros métodos vêm sendo empregados como a adição de ultrassom aos métodos de hidrólise anteriores citados, tratamento de líquido iônico e refluxo. Quanto as caracterizações, as mais empregadas são espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier, difração de raios-X, termogravimetria e microscopia eletrônica de varredura.

Tabela 2 - Trabalhos referentes à obtenção de hidroxiapatitas a partir de resíduos do processamento de peixes

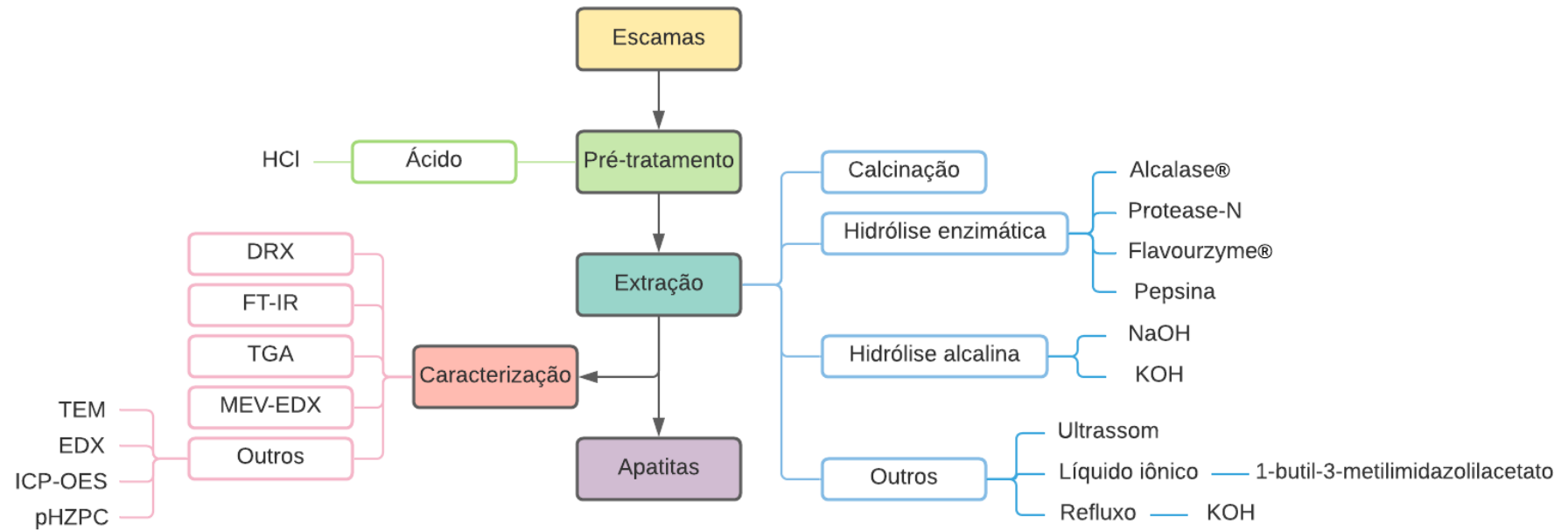
Material	Pré-tratamento	Método de obtenção	Caracterização	Rendimento (?)	Razão Ca/P	Aplicação	Referência
Ossos de peixe atum (<i>Thunnus thynnuse</i>) e peixe-espada (<i>Xiphias gladius</i>).	Fervura por 1 h e secagem em temperatura ambiente por 24 h.	Calcinação a 600°C e 950°C por 12 h.	MEV-EDX, TEM, DRX, FTIR, ICP-OES, Raman.	-	Valor médio: 1,87	Substituição óssea.	Boutinguiza <i>et al.</i> (2012).
Escama de Tilápia (<i>Tilapia nilótica</i>).	HCl 0,1 mol/L, NaOH 5% (p/v) a 70°C por 5 h.	Hidrólise alcalina: NaOH 50% (p/v) a 100°C por 1 h.	TEM, ICP-OES, área superficial específica, DRX, FTIR, TGA, pHPZC.	-	1,66	Tratamento de efluentes: adsorção de selênio.	Kongsri <i>et al.</i> (2013).
Ossos e escama de tilápia (espécie não mencionada).	Fervura por 2 h e secagem em temperatura ambiente por 2 dias.	Calcinação a 800°C, 900°C e 1000°C por 5 h.	DRX, MEV-EDX		1,77; 1,69 e 1,71 (respectivamente)	Apatitas de fonte alternativa.	Mustafa <i>et al.</i> (2015).
Escamas de tilápia (<i>Oreochromis sp.</i>).	Lavagem.	Hidrólise enzimática: protease N 1% por 2,5 h. Flavourzyme 0,5% por 30 min. Posterior calcinação a 800°C por 4 h.	DRX, distribuição do tamanho de partícula, densidade aparente, EDX, FTIR, MEV, quantificação de proteínas.	-	1,78	Reparação óssea.	Huang, Hsiao e Chai (2011).
Escamas de tilápia (<i>Oreochromis niloticus</i>).	HCl 0,1 mol/L.	Hidrólise alcalina: NaOH 5M a 100°C por 1 h. Posterior calcinação a 1200°C por 2 h.	FTIR, MEV-EDX, DRX.	36%.	1,83	Potencial uso em aplicações biomédicas.	Zainol <i>et al.</i> (2019).

Tabela 2 (cont.) - Trabalhos referentes à obtenção de hidroxiapatitas a partir de resíduos do processamento de peixes

Escamas de tilápia (<i>Oreochromis niloticus</i>).	Lavagem e secagem a 105°C.	Calcinação a 400°C, 600°C e 800°C.	TGA, DTG, FTIR, DRX, MEV-EDX.	-	1,48	Potencial uso em aplicações biomédicas.	Ferruzzi (2017).
Escamas de Catla (<i>Catla catla</i>) e Tilapia (<i>Oreochromis niloticus</i>).	HCl 1 mol/L por 30 min, NaOH 6 N aquecido em banho maria por 30 min.	Calcinação a 800°C por 2 h.	FE-MEV-EDX, DRX, FTIR, TGA, DSC.	-	-	Potencial uso como <i>scaffold</i> .	Buraiki <i>et al.</i> (2019).
Escamas de Rohu (<i>Labeo rohita</i>).	HCl 1 N por 24 h e secagem a 50°C por 12 h.	Calcinação a 1000°C por 4 h.	FTIR, DRX, TGA, MEV-EDX, TEM.	24,33%.	1,65	Potencial uso em aplicações biomédicas.	Deb <i>et al.</i> (2019).
Escamas de mrigal (<i>Cirrhinus mrigala</i>).	HCl 0,1 mol/L, NaOH 5% (p/v) a 70°C por 7 h.	Hidrólise alcalina: NaOH 50% (p/v) a 100°C por 2 h.	DRX, FTIR, TEM, EDX, TGA.	-	1,67	Reparação óssea.	Sathiskumar <i>et al.</i> (2019).

Fonte: Autoria própria (2021)

Figura 9 – Etapas envolvidas no processo de obtenção de hidroxiapatitas



Fonte: Autoria própria (2021).

5.7.2.1 Pré-tratamento

A realização do pré-tratamento tem por objetivo de remover substâncias indesejáveis, que podem ser sujidades (sangue, gordura, pedaços de tecidos, etc) e também as proteínas presentes nas escamas. Para tanto, são comumente empregadas soluções ácidas.

Muitos dos estudos analisados utilizaram para o pré-tratamento uma solução ácida com baixas concentrações de HCl, seguida de neutralização com solução alcalina (NaOH). Contudo, observou-se ainda o uso de fervura ou somente lavagem com água. Antes de seguir para as próximas etapas, normalmente as escamas de peixes são moídas em pequenos pedaços.

De acordo com Kongsri *et al.* (2013) a utilização de pré-tratamentos ácidos nas escamas geram HAp com maiores poros e uma maior área superficial, propriedades estas que podem ser importantes em aplicações que envolvem adsorção ou até mesmo *scaffolds*.

No estudo de Deb *et al.* (2019) foram explorados os efeitos da desproteínização ácida nas propriedades físico-químicas e biológicas de hidroxiapatitas extraídas de escamas de *Catla catla*. De acordo com os autores, as propriedades no material obtido foram ideais para aplicações biomédicas.

5.7.2.2 Métodos de extração de apatitas

A etapa de extração é uma das mais críticas de todo o processo de obtenção das apatitas, pois pode ser determinante no rendimento obtido, na composição de fase, na razão Ca/P, dentre outros parâmetros. Nas próximas seções serão apresentados os principais métodos de obtenção de hidroxiapatitas de escamas de peixe, sendo eles: calcinação, hidrólise enzimática e hidrólise alcalina.

5.7.2.2.1 Calcinação

A calcinação é um tratamento térmico de sólidos, que promove transformações físico-químicas, é utilizado quando busca-se remover uma fase volátil quimicamente ligada ao sólido, decompor a substância termicamente, produzir óxidos, ou mudar a estrutura cristalina (BRITANNICA, 2016).

O processo de calcinação é considerado uma forma inteligente de produzir hidroxiapatitas devido a metodologia relativamente simples e baixo custo. A energia fornecida na forma de calor ao material promove uma mudança direta na organização dos átomos, que influencia no tamanho e morfologia dos cristais (FERRUZZI, 2017). Além disso, a calcinação promove a remoção dos compostos orgânicos presentes no material (ZAINOL *et al.*, 2019).

A temperatura de calcinação, tempo da calcinação, e natureza do material do qual foi realizada a extração são fatores que influenciam nas propriedades finais das apatitas, como razão Ca/P, pureza de fase, morfologia, área superficial e distribuição de tamanho dos poros (TERZIOĞLU; ÖĞÜT; KALEMTAŞ, 2018).

Durante a calcinação das apatitas pode ocorrer o processo de decomposição da fração inorgânica, que é na maioria das vezes indesejável, pois promove alteração da estrutura química das apatitas. Estudos mostraram que a calcinação realizada em rejeitos de animais pode resultar em dois tipos de decomposição, em que CaO ou β -fosfato tricálcico ($\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$) são formados. Há indícios de que o CaO é formado em minerais ósseos calcinados quando a relação Ca/P é maior do que o estequiométrico (1,67) e que β -fosfato tricálcico é formado quando Ca/P é menor que 1,67 (GOTO; SASAKI, 2014).

A temperatura de calcinação impacta na coloração final do produto, de acordo com Ozawa e Suzuki (2002), a calcinação em baixas temperaturas (600°C) produz pós escuros (preto/cinza), enquanto a calcinação em altas temperaturas (>800°C) produz pós brancos, resultado de uma eficiente remoção da matéria orgânica (TERZIOĞLU; ÖĞÜT; KALEMTAŞ, 2018). Dependendo da aplicação, a coloração se torna uma propriedade importante, como no caso das porcelanas dentais.

No trabalho de Mustafa *et al.* (2015), as hidroxiapatitas foram calcinadas na faixa de temperatura entre 800°C a 1000°C a uma taxa de aquecimento de 5°C/min em 5 h. As HAp foram caracterizadas antes e depois do processo, e concluiu-se que a melhor temperatura foi a 900°C, obtendo uma relação Ca/P de 1,699 o que é muito próxima da relação estequiométrica ideal.

No estudo de Huang, Hsiao e Chai (2011), após as hidroxiapatitas serem extraídas das escamas tilápia por hidrólise enzimática, foram calcinadas sob temperatura de 800°C por 4 h. A rugosidade da superfície e a porosidade aumentaram após a calcinação, e a relação obtida de Ca/P foi de 1,76.

Embora existam várias técnicas de extração de hidroxiapatitas, a calcinação é uma das rotas mais tradicionais observada na literatura, uma vez que não exige grandes investimentos, é de simples realização e geralmente atinge resultados satisfatórios. No entanto, a demanda energética para tal procedimento é elevada em comparação aos demais métodos. Além disso, a técnica pode ser utilizada em conjunto com outros métodos de extração, com o objetivo de obter propriedades mais adequadas no material. Quanto às condições de calcinação, as temperaturas mais comuns nos trabalhos avaliados, se encontram na faixa 800°C a 1000°C.

5.7.2.2.2 Hidrólise enzimática

A hidrólise enzimática é uma técnica que vem sendo empregada também para a obtenção de hidroxiapatitas, nesta abordagem as enzimas são utilizadas para degradar completamente o colágeno. Para isto enzimas específicas são utilizadas, e a reação realizada nas condições de temperatura e pH ideais. Após a hidrólise as enzimas podem ser desativadas a altas temperaturas e as HAp obtidas por centrifugação (MOHD PU'AD *et al.*, 2019).

No estudo de Huang e Chu (2013) hidroxiapatitas foram isoladas de escamas de tilápia (*Oreochromis sp.*) utilizando Protease N (1%) por 2,5 h e Flavourzyme (0,5%) por 0,5 h. Os hidrolisados foram aquecidos por 10 min em banho maria para desativar as enzimas e então centrifugados a 12.000 g por 20 min. O material obtido foi calcinado a 800 °C por 4 h e foi utilizado para a

fabricação de uma membrana contendo gelatina e quitosana. Foi observado que o material promoveu a diferenciação osteogênica e mineralização de células MG-63.

A técnica é considerada menos poluente por não utilizar produtos químicos, mas as enzimas possuem um valor elevado e como são desativadas ao final da extração, o processo se torna caro e difícil de escalonar. Diferentemente da extração do colágeno, em que as enzimas conferem características avançadas ao produto final, na extração enzimática de apatitas as enzimas são utilizadas apenas para remover a porção orgânica, sem conferir propriedades notáveis por si só.

5.7.2.2.3 Hidrólise alcalina

A hidrólise alcalina é um processo químico que envolve a combinação de pH alto e calor, no qual as ligações peptídicas são quebradas e as proteínas são convertidas em peptídeos ou aminoácidos (HOMER *et al.*, 2012). A utilização da base tem por intuito remover o colágeno e outros compostos orgânicos da matéria-prima deixando apenas a apatita natural (BARAKAT *et al.*, 2008). Neste método, a solução alcalina utilizada geralmente é de NaOH (foi reportado também o uso de KOH), e as apatitas podem ser enxaguadas e separadas da solução por centrifugação.

Zainol *et al.* (2019) realizou a extração alcalina a quente de escamas de tilápia (*Oreochromis niloticus*). A extração foi realizada com hidróxido de sódio 5 mol/L, aquecida até 100°C e mantida sob agitação durante 1 h. Em seguida foi realizada calcinação a 1200°C por 2 h. O resultado obtido foi a presença de pureza de fase e alto grau de cristalinidade. No trabalho de Kongsri *et al.* (2013), foi utilizado um procedimento semelhante, a extração alcalina foi realizada adicionando 50% (p/v) de NaOH ao pó previamente tratado, aquecido até 100°C e agitado por 1 h.

No estudo de Venkatesan *et al.* (2011) foram obtidas hidroxiapatitas de atum (*Thunnus obesus*) utilizando o método de calcinação térmica e o método de hidrólise alcalina. Foi realizada a comparação dos produtos por meio de

análises químicas, físicas e microscópicas. De acordo com os autores, a hidrólise alcalina se demonstrou ser a melhor abordagem pois o produto final apresentou propriedades físico-químicas, como pureza e tamanho de cristais, mais adequadas para aplicações biomédicas.

A hidrólise alcalina foi observada como um dos métodos mais empregados na obtenção de hidroxiapatitas de diversas fontes naturais, incluindo as escamas de peixe. O método é relativamente simples e é capaz de produzir partículas nanoestruturadas, mas possui a desvantagem de utilizar uma base, que pode ser prejudicial ambientalmente.

5.7.2.2.4 Outros métodos

Assim como para a extração do colágeno, existem estudos que exploram a utilização do ultrassom para obter rendimentos maiores no processo de extração de apatitas de origem biológica. O trabalho de Sricharoen *et al.* (2020) realizou a extração ácida de escamas de tilápia em conjunto com o ultrassom, os resultados da caracterização indicaram a formação de nanopartículas em forma de bastões (cerca de 22,8 nm de comprimento e 8,6 nm de diâmetro).

Muhammad *et al.* (2016) desenvolveu um método de extração de hidroxiapatitas de escamas de carpa (*Cyprinidae sp.*) utilizando pré-tratamento de líquido iônico. Nesta técnica, o líquido iônico utilizado possui a propriedade de basicidade da ligação de hidrogênio, permitindo dissolver biopolímeros como colágeno, enquanto a parte inorgânica (HAp) permanece não dissolvida (MOHD PU'AD *et al.*, 2019). Assim, no estudo de Muhammad *et al.* (2016), após a lavagem, secagem e moagem, as escamas foram tratadas com 1-butil-3-metilimidazolilacetato em água fervente por 12 h, ajustando o pH da solução para alcalino. Após etapas de precipitação e centrifugação, as hidroxiapatitas apresentaram relação Ca/P de 1,60 e apresentaram boa biocompatibilidade com células 293 de rim embrionárias humanas (células HEK) e células de carcinoma epidermóide (células A431).

No estudo de Cahyanto *et al.* (2017) foi investigada a extração de hidroxiapatitas a partir de resíduos ósseos de peixes utilizando o método de

refluxo, que consiste no processamento por refluxo usando soluções de KOH e H_3PO_4 . De acordo com as análises realizadas, hidroxiapatitas foram sintetizadas com sucesso a utilizando este método.

Em conclusão, as hidroxiapatitas derivadas de escamas de peixes usando diferentes métodos de extração exibem características diferentes, incluindo estrutura porosa, relação Ca/P, biocompatibilidade, etc. O uso dos métodos de hidrólise promove apenas a remoção dos componentes orgânicos e permitem a extração das HAp puras, sem alterar a estrutura química das mesmas. Já o uso da técnica de calcinação pode gerar outras fases de fosfatos de cálcio, muitas vezes indesejadas. Em termos de cristalinidade, o uso de calcinação gera fases de maior cristalinidade em comparação com os outros métodos. Por isso a escolha do método de obtenção das apatitas deve ser avaliada considerando os prós e contras de cada técnica e quais serão os impactos na futura aplicação.

5.8 Técnicas analíticas e de caracterização dos biomateriais

A caracterização do colágeno permite estabelecer diversas propriedades e como massa molecular, perfil de aminoácidos, grau de hidrólise, pureza, entre outros. Para tanto, diversas técnicas podem ser utilizadas, na próxima seção será apresentada uma revisão sobre as mais utilizadas para a caracterização do colágeno, sendo elas:

- Eletroforese em gel de dodecil sulfato de sódio;
- Cromatografia líquida de alta eficiência;
- Espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier.

As HAp podem ser caracterizadas em termos de sua estrutura e parâmetros de qualidade empregando-se uma série de métodos e técnicas analíticas diferentes que quantificam tais parâmetros-chave, incluindo a composição de fase (estrutura cristalina) e composição química, razão Ca/P e teor de elementos traço. Os métodos mais empregados são:

- Difração de raios-X;

- Espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier;
- Termogravimetria;
- Microscopia eletrônica de varredura.

A seguir serão apresentados com mais detalhes cada uma dessas técnicas analíticas.

5.8.1 Eletroforese em gel de dodecil sulfato de sódio-poliacrilamida (SDS-PAGE)

A determinação da massa molecular de hidrolisados de colágeno é uma tarefa difícil devido a sua baixa massa molecular. A técnica mais utilizada para este fim é o SDS-PAGE (eletroforese em gel de dodecil sulfato de sódio-poliacrilamida), pois realiza de maneira eficiente a separação do colágeno e proporciona alta resolução (HAIDER; REID; SHARP, 2012; MENARD, 2013).

O método se baseia na desnaturação das proteínas com um detergente aniônico (dodecil sulfato de sódio) que também se liga a elas, transmitindo uma carga negativa proporcional à sua massa. Em seguida é realizada a eletroforese em gel de acrilamida que separa proteínas com excelente resolução com base na massa molecular (NOWAKOWSKI; WOBIG; PETERING, 2014).

Além de estimar a massa molecular, esta técnica permite: estimar a pureza de proteínas, quantificar proteínas, monitorar a integridade de proteínas, comparar a composição polipeptídica de diferentes amostras, entre outros (G-BIOSCIENCES, 2013). Nos trabalhos analisados, além de estimar a massa molecular, o SDS-PAGE permitiu determinar o tipo de colágeno presente nas amostras, pela análise das subunidades (cadeias α), e também permitiu determinar a presença de cadeias reticuladas.

5.8.2 Cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC)

Os métodos cromatográficos são muito utilizados para a caracterização da composição de materiais, sendo muito empregados na caracterização do colágeno. Na cromatografia um material sólido poroso com propriedades químicas adequadas (fase estacionária) é retido em uma coluna, e a solução com o composto de interesse (fase móvel) percola através da coluna. Os peptídeos migram mais rápido ou mais lentamente através da coluna dependendo de suas propriedades (NELSON; COX, 2004).

Os aminoácidos são as unidades estruturais básicas das proteínas, assim torna-se necessária a sua quantificação e a qualificação para um melhor entendimento da qualidade e das propriedades da proteína obtida (CARREIRA *et al.*, 2002).

Para avaliar o perfil de aminoácidos muitos estudos utilizam a cromatografia líquida de alta eficiência. O HPLC é um aperfeiçoamento dos métodos cromatográficos em que as separações são altamente resolutivas e são alcançadas usando suportes microparticulados uniformes. As vantagens do HPLC sobre os cromatográficos mais convencionais as técnicas são muitas, incluindo tempos de separação rápidos, altas recuperações, resolução aprimorada e maior sensibilidade (SMITH, 1993).

5.8.3 Espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier (FTIR)

A análise FTIR é utilizada em diversas áreas, como síntese orgânica, ciência de polímeros, indústria farmacêutica e análise de alimentos. A técnica é utilizada para a identificação e caracterização de materiais, utilizando luz infravermelha para escanear as amostras, e permite também detectar contaminantes em um material, presença de aditivos e identificando decomposição e oxidação (TITUS; JAMES JEBASEELAN SAMUEL; ROOPAN, 2019).

A técnica se baseia na identificação de grupos funcionais presentes nas moléculas, em que estes vibram quando irradiados com comprimentos de onda específicos. Essas vibrações e sua intensidade são plotadas contra a frequência de luz para produzir um espectro FTIR. Cada molécula tem uma “impressão digital” única, o que torna o FTIR uma ferramenta importante para identificação química (DAÉID, 2004; TITUS; JAMES JEBASEELAN SAMUEL; ROOPAN, 2019).

O espectro de FTIR pode fornecer informações significativas sobre apatitas sintéticas e biológicas. Os grupos fosfato, hidroxila, carbonato, entre outros, produzem bandas de vibração que podem fornecer informações significativas sobre o efeito das condições de processamento das HAp e também podem ajudar a distinguir outras fases de fosfato de cálcio.

O espectro de FTIR também permite a identificação do colágeno e determinação do tipo presente na amostra, levando em consideração as diferentes estruturas encontradas no colágeno, como presença de estruturas complexas (secundária, terciária e quaternária), domínios N e C terminais, ligações de hidrogênio, *crosslinking*, entre outros.

5.8.4 Difração de raios X (DRX)

Muito utilizado na caracterização de apatitas, a difração de raios X é um método de caracterização que fornece informações quanto ao tamanho, perfeição e orientação cristalina, possibilitando um estudo detalhado do reticulado cristalino. É uma técnica de análise não destrutiva, rápida e muito versátil (ALMEIDA NETO, 2011).

Neste método, um feixe de raios X é irradiado em direção ao material e a intensidade do feixe difratado é medida em função do ângulo incidente (OMIDI *et al.*, 2017). A distância interplanar, ou seja, o espaço atômico nos planos no material, podem ser calculados pela Lei de Bragg, conforme a Equação 1.

$$2d \sin \theta = \lambda \quad (1)$$

Sendo λ o comprimento de onda dos raios X (nm), d a distância interplanar (nm) e θ o ângulo de incidência (graus).

Nos estudos avaliados, o DRX foi útil para a confirmação de que HAp foram formadas ou obtidas, além de permitir determinar as fases encontradas, a presença de vestígios de impurezas (e.g. óxidos ou orgânicas) e o tamanho médio do cristalito.

5.8.5 Termogravimetria (TGA)

A termogravimetria é um método analítico utilizado para determinar a estabilidade térmica de um material e sua fração de componentes voláteis. A técnica consiste no aquecimento da amostra a uma taxa constante e monitoramento da mudança do peso. A medição é normalmente realizada na presença de ar ou em atmosfera inerte, como hélio ou argônio (RAJISHA *et al.*, 2011).

Nos trabalhos avaliados, observou-se um certo padrão na curva termogravimétrica obtida a partir de HAp de escamas de peixe. O início da curva pode apresentar uma perda de peso na faixa de temperatura de 100-300°C, correspondente à perda completa de umidade da amostra. A segunda perda de peso, geralmente observada, ocorre na faixa de 300-600°C, e é atribuída à decomposição de compostos orgânicos, especialmente constituintes de colágeno. A decomposição em estágio posterior (700-800°C ou mais) está relacionada estabilidade térmica das hidroxiapatitas e a formação eventual de outras estruturas inorgânicas como óxidos, por exemplo. Vale ressaltar que as faixas de temperatura acima citadas podem apresentar variações ou ainda apresentar ausência de perdas significativas, já que dependem de diversas propriedades do material.

5.8.6 Microscopia eletrônica de varredura acoplada à espectroscopia de Raios-X por dispersão de energia (MEV-EDX)

A microscopia eletrônica de varredura (MEV) é uma técnica muito comum de geração de imagens da microestrutura e morfologia de materiais. Em MEV as imagens são geradas por um feixe de elétrons que percorre toda a superfície da amostra. Os elétrons interagem com os átomos presentes na superfície produzindo sinais que revelam informações sobre a morfologia e composição da superfície da amostra, sendo a composição avaliada pelo MEV-EDX (PINTO; OLIVEIRA; FALCÃO, 2018). O uso combinado de microscopia eletrônica de varredura (MEV) e a espectroscopia de energia dispersiva (EDX) proporciona uma análise visual (qualitativa) e semi-quantitativa do material, possibilitando tanto o conhecimento estrutural quanto a composição da amostra analisada (FERRUZZI, 2017).

O MEV-EDX, quando utilizado para a caracterização de hidroxiapatitas de escamas de peixe permite a avaliação da estrutura porosa, como uniformidade, formato e tamanho dos poros e também permite determinar sua composição, utilizada para estimar a relação Ca/P.

5.9 Lacunas a serem exploradas

Ainda existem grandes desafios no desenvolvimento e aplicação dos compostos derivados de escamas de peixes, pesquisas futuras devem concentrar-se em superar as barreiras à transferência de resultados laboratoriais para a escala industrial (*scale-up* de processos). Estudos para reduzir os custos dos procedimentos são necessários para o desenvolvimento de processos industriais competitivos economicamente. Outras lacunas importantes da pesquisa são a falta de otimização dos processos visando maiores teores de rendimento e recuperação dos compostos, falta de produção de produtos de massa molecular controlada com funções específicas, falta de avaliação econômica dos processos em escala industrial.

Além disso, existem poucas abordagens que visam recuperar simultaneamente ambos os biomateriais (colágeno e apatitas) presentes nas escamas, que seria interessante do ponto de vista da melhor utilização dos recursos. Tal procedimento, emprega o conceito de aproveitamento integral da biomassa (conceito de biorrefinaria), que proporciona uma redução do custo global de produção e impacta fortemente sobre a eficiência técnico-econômica do processo.

Próximos passos também são ainda necessários, no que se refere às aplicações dos biomateriais, como a realização de maiores quantidades de testes dos biomateriais em animais e humanos, já que a maioria dos estudos verificados são realizados *in vitro*. Também, existem diversas outras técnicas que são utilizadas para colágeno obtido de outras fontes, e que devem ser testadas para as escamas de peixes, como por exemplo técnicas de purificação mais refinadas.

6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Como base no material bibliográfico levantado e aqui apresentado, verifica-se que os resíduos de peixes se configuram como uma fonte alternativa de colágeno e apatitas com boa relação custo-benefício e que podem ser empregados em diversas aplicações tecnológicas. Dentre as mais importantes áreas de aplicação do colágeno de escamas de peixe se encontram a biomedicina, cosmetologia, farmácia e suplementação alimentar. Para as hidroxiapatitas as principais aplicações envolvem áreas biomédicas, odontológicas e de tratamento de efluentes. Existem ainda áreas nas quais as aplicações desses compostos precisam ser investigadas, mas eles podem ser vistos como uma grande possibilidade em potencial no desenvolvimento de biomateriais.

Neste estudo foram abordados os trabalhos recentes nesta área, ou seja, o estado da arte, permitindo determinar as principais técnicas e rotas utilizadas no pré-tratamento, extração, purificação e caracterização do colágeno e hidroxiapatitas derivados de escamas. Diante disso, é possível concluir que a escolha de cada método deve se basear principalmente nas características desejadas para a aplicação em específico, recursos disponíveis e sustentabilidade do processo.

Apesar das restrições e dificuldades mencionadas, tendo em vista o caráter residual e renovável das escamas de peixe, bem como seu mercado crescente, visualiza-se um elevadíssimo potencial em termos de viabilidade técnico-econômica, bem como sustentabilidade, para a valorização destes resíduos na produção de biomateriais de elevado valor agregado. Além disso, o aproveitamento desse material pode contribuir com o desenvolvimento econômico regional (oeste do PR) e nacional.

REFERÊNCIAS

ALMEIDA NETO, A. F. **Caracterização e avaliação de argilas como adsorventes na remoção e eleição de íons de cobre e mercúrio em diferentes sistemas**. 2011. Dissertação de doutorado - Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2011.

AN, B.; LIN, Y. S.; BRODSKY, B. Collagen interactions: Drug design and delivery. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 97, p. 69–84, 2016.

APPLEFORD, M. R. et al. In vivo study on hydroxyapatite scaffolds with trabecular architecture for bone repair. **Journal of Biomedical Materials Research Part A**, v. 89, p. 1019–1027, 2009.

ARESTA, M.; DIBENEDETTO, A.; DUMEIGNIL, F. **Biorefinery: From biomass to chemicals and fuels**. 1. ed. Berlim: Walter de Gruyter, 2012,

AWANG, N. A.; AMID, A.; ARSHAD, Z. I. Method for purification of collagen: A systematic review. **Asia Pacific Journal of Molecular Biology and Biotechnology**, v. 28, n. 3, p. 99–112, 2020.

BARAKAT, N. A. M. et al. Physicochemical characterizations of hydroxyapatite extracted from bovine bones by three different methods: Extraction of biologically desirable HAp. **Materials Science and Engineering C**, v. 28, n. 8, p. 1381–1387, 2008.

BASTIDAS-OYANEDEL, J.-R.; SCHMIDT, J. E. **Biorefinery: Integrated Sustainable Processes for Biomass Conversion to Biomaterials, Biofuels and Fertilizers**. [s.l.] Springer, 2019.

BERNARDES, J. **Estrutura com polímeros estimula regeneração de tecidos**. Disponível em: <<http://www.usp.br/agen/?p=228138>>. Acesso em: 7 ago. 2012.

BOUTINGUIZA, M. et al. Biological hydroxyapatite obtained from fish bones. **Materials Science and Engineering C**, v. 32, n. 3, p. 478–486, 2012.

BOVA, M. L. T. **Reaproveitamento de resíduo industrial da pesca: extração de colágeno de escamas de corvina (micropogonias furnieri) e produção de seu hidrolisado**. 2016. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia Ambiental) - Universidade do Vale do Itajaí, Itajaí, 2016.

BRITANNICA. **Calcination**. Disponível em: <<https://www.britannica.com/technology/calcination>>. Acesso em: 17 maio. 2021.

BURAIKI, N. S. S. Al et al. Characterization of Catla catla and Oreochromis niloticus fish scales derived hydroxyapatite scaffolds for regenerative medicine. **Materials Today: Proceedings**, v. 27, p. 2609–2616, 2019.

CAHYANTO, A. et al. Fabrication of hydroxyapatite from fish bones waste using reflux method. **Journal of Physics: Conference Series**, v. 172, 2017.

CARREIRA, R. L. et al. Emprego de cromatografia líquida de alta eficiência hidrofílica na determinação dos aminoácidos de hidrolisados de caseína.

Ciência e Tecnologia de Alimentos, v. 22, n. 3, p. 229–232, 2002.

CHAI, H. J. et al. Effects of sizes and conformations of fish-scale Collagen peptides on facial skin qualities and transdermal penetration efficiency. **Journal of Biomedicine and Biotechnology**, v. 2010, 2010.

CHEN, S. et al. Rapid isolation of high purity pepsin-soluble type I collagen from scales of red drum fish (*Sciaenops ocellatus*). **Food Hydrocolloids**, v. 52, p. 468–477, 2016.

COLEN, A. G. N. et al. Aplicabilidades de materiais residuais de origem lignocelulósica. **Revista Multidebates**, v. 3, n. 2, p. 232–247, 2019.

CONTRERAS-GUZMÁN, E. S. **Bioquímica de Pescados e Derivados**. Jaboticabal: FUNEP, 1994.

DAÉID, N. N. Forensic Sciences - Systematic Drug Identification. **Encyclopedia of Analytical Science: Second Edition**, v. 3, n. 1997, p. 471–480, 2004.

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

DEB, P. et al. Synthesis of hydroxyapatite from *Labeo rohita* fish scale for biomedical application. **Materials Today: Proceedings**, v. 15, p. 277–283, 2019.

DEVITASARI, S. P.; HUDIYATI, M.; ANASTASIA, D. Effect of hydroxyapatite from waste of tilapia bone (*Oreochromis niloticus*) on the surface hardness of enamel. **Journal of Physics: Conference Series**, v. 1246, n. 1, 2019.

DUMINIS, T.; SHAHID, S.; HILL, R. G. Apatite glass-ceramics: A review. **Frontiers in Materials**, v. 3, p. 1–15, 2017.

ELLIOT, J. C. **Structure and Chemistry the Apatites and Other Calcium Orthophosphates**. [s.l.] Elsevier, 1994.

EMATER. **Projeto Piscicultura: Resumo Executivo**. Disponível em: <<http://www.emater.pr.gov.br/modules/conteudo/conteudo.php?conteudo=71>>. Acesso em: 22 set. 2019.

FAO. **The State of World Fisheries and Aquaculture 2020: Meeting the sustainable development goals**. Disponível em: <<http://www.fao.org/state-of-fisheries-aquaculture>>. Acesso em: 24 jun. 2021.

FELTES, M. M. C. et al. Alternativas para a agregação de valor aos resíduos da industrialização de peixe. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, v. 14, n. 6, p. 669–677, 2010.

FERRARO, V. et al. Extraction of high added value biological compounds from sardine, sardine-type fish and mackerel canning residues - A review. **Materials Science and Engineering C**, v. 33, n. 6, p. 3111–3120, 2013.

FERRUZZI, A. C. S. **Obtenção de apatita a partir das escamas do peixe tilápia do nilo (*Oreochromis niloticus*) empregando o processo de calcinação**. 2017. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) - Universidade Estadual do Oeste do Paraná, Toledo, 2017.

FOGAÇA, F. **O protagonismo do Brasil na produção mundial de pescado.** Disponível em: <<https://www.embrapa.br/busca-de-noticias/-/noticia/53738345/artigo---o-protagonismo-do-brasil-na-producao-mundial-de-pescado>>. Acesso em: 24 jun. 2021.

G-BIOSCIENCES. **Protein electrophoresis - Handbook and selection guide** [s.l: s.n.]. Disponível em: <https://cdn.gbiosciences.com/pdfs/handbook/Protein_Electrophoresis_Handbook.pdf>. Acesso em: 20 nov. 2022.

GLOBO RURAL. **Produção de peixes de cultivo cresce 4,9% e ultrapassa 758 mil.** Disponível em: <[toneladashttps://revistagloborural.globo.com/Noticias/Criacao/Peixe/noticia/2020/02/producao-de-peixes-de-cultivo-cresce-49-e-ultrapassa-758-mil-toneladas.html](https://revistagloborural.globo.com/Noticias/Criacao/Peixe/noticia/2020/02/producao-de-peixes-de-cultivo-cresce-49-e-ultrapassa-758-mil-toneladas.html)>. Acesso em: 2 dez. 2019.

GOTO, T.; SASAKI, K. Effects of trace elements in fish bones on crystal characteristics of hydroxyapatite obtained by calcination. **Ceramics International**, v. 40, n. 7 PART B, p. 10777–10785, 2014.

HAIDER, S. R.; REID, H. J.; SHARP, B. L. Tricine-SDS-PAGE. **Nature Protocols**, v. 1, n. 1, p. 81–91, 2012.

HIMONIDES, A. T.; TAYLOR, A. K. D.; MORRIS, A. J. A Study of the Enzymatic Hydrolysis of Fish Frames Using Model Systems. **Food and Nutrition Sciences**, v. 02, n. 06, p. 575–585, 2011.

HOMER, L. C. et al. Decontamination and digestion of infectious animal waste using a tissue dissolver in an animal biosafety level 3 facility. **Lab Animal**, v. 41, n. 11, p. 327–335, 2012.

HUANG, C. Y. et al. Evaluation of iron-binding activity of collagen peptides prepared from the scales of four cultivated fishes in Taiwan. **Journal of Food and Drug Analysis**, v. 23, n. 4, p. 671–678, 2015.

HUANG, C. Y. et al. Isolation and characterization of fish scale collagen from tilapia (*Oreochromis sp.*) by a novel extrusion-hydro-extraction process. **Food Chemistry**, v. 190, p. 997–1006, 2016.

HUANG, Y. C.; CHU, H. W. Using hydroxyapatite from fish scales to prepare chitosan/gelatin/ hydroxyapatite membrane: Exploring potential for bone tissue engineering. **Journal of Marine Science and Technology (Taiwan)**, v. 21, n. 6, p. 716–722, 2013.

HUANG, Y. C.; HSIAO, P. C.; CHAI, H. J. Hydroxyapatite extracted from fish scale: Effects on MG63 osteoblast-like cells. **Ceramics International**, v. 37, n. 6, p. 1825–1831, 2011.

IZZATI, H.; ZAINOL; HANIM, H. Low Molecular Weight Collagen from Tilapia Fish Scales for Potential Cosmetic Application. **Pharma Chemica**, v. 9, n. 97, p. 108–114, 2017.

JENKELUNAS, P. J.; LI-CHAN, E. C. Y. Production and assessment of Pacific hake (*Merluccius productus*) hydrolysates as cryoprotectants for frozen fish mince. **Food Chemistry**, v. 239, p. 535–543, 2018.

- KIM, H. K. et al. Application of ultrasonic treatment to extraction of collagen from the skins of sea bass *Lateolabrax japonicus*. **Fisheries Science**, v. 79, n. 5, p. 849–856, 2013.
- KONGSRI, S. et al. Nanocrystalline hydroxyapatite from fish scale waste: Preparation, characterization and application for selenium adsorption in aqueous solution. **Chemical Engineering Journal**, v. 215–216, p. 522–532, 2013.
- LEE, C. H.; SINGLA, A.; LEE, Y. Biomedical applications of collagen. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 221, p. 1–22, 2001.
- LEE, J. H. et al. Control of osteogenic differentiation and mineralization of human mesenchymal stem cells on composite nanofibers containing poly[lactic-co- (glycolic acid)] and hydroxyapatite. **Macromolecular Bioscience**, v. 10, n. 2, p. 173–182, 2010.
- LIANG, Q. et al. Isolation and characterization of collagen from the cartilage of Amur sturgeon (*Acipenser schrenckii*). **Process Biochemistry**, v. 49, n. 2, p. 318–323, 2014.
- LIAW, B. S. et al. Fish scale-extracted hydroxyapatite/chitosan composite scaffolds fabricated by freeze casting—An innovative strategy for water treatment. **Journal of Hazardous Materials**, v. 382, n. April 2019, p. 121082, 2020.
- LIM, Y. S. et al. Marine collagen as a promising biomaterial for biomedical applications. **Marine Drugs**, v. 17, n. 8, 2019.
- LORENZETTI, A. **Efeito do ultrassom na hidrólise enzimática das proteínas do soro lácteo e disponibilidade in vitro**. 2018. Universidade Federal de Santa Catarina, 2018.
- MAITY, S. K. Opportunities, recent trends and challenges of integrated biorefinery: Part i. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 43, p. 1427–1445, 2015.
- MARTINS, M. E. de O. et al. **Obtenção de Gelatina a partir de Escama de Tilápia (*Oreochromis niloticus*): Características Químicas e Físico-químicas** *Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento - Embrapa*, 2015. .
- MENARD, R. Tricine - SDS-PAGE. In: **Malaria: Methods and Protocols**. 2. ed. [s.l.] Humana Press, 2013. 869p. 81–91.
- MÉNENDEZ-PROUPIN, E. et al. Computer simulation of elastic constants of hydroxyapatite and fluorapatite. **Journal of the Mechanical Behavior of Biomedical Materials**, v. 4, n. 1, p. 1011–1020, 2011.
- MOHD PU'AD, N. A. S. et al. Syntheses of hydroxyapatite from natural sources. **Heliyon**, v. 5, n. 5, p. e01588, 2019.
- MUHAMMAD, N. et al. Extraction of biocompatible hydroxyapatite from fish scales using novel approach of ionic liquid pretreatment. **Separation and Purification Technology**, v. 161, p. 129–135, 2016.
- MUSTAFA, N. et al. Hydroxyapatite extracted from Waste Fish Bones and

- Scales via Calcination Method. **Applied Mechanics and Materials**, v. 773–774, p. 287–290, 2015.
- MUZAIFA, M.; SAFRIANI, N.; ZAKARIA, F. Production of protein hydrolysates from fish by-product prepared by enzymatic hydrolysis. **AAFL Bioflux**, v. 5, n. 1, p. 36–39, 2012.
- NAGAI, T.; IZUMI, M.; ISHII, M. Fish scale collagen. Preparation and partial characterization. **International Journal of Food Science and Technology**, v. 39, n. 3, p. 239–244, 2004.
- NAIR, A. K. et al. Molecular mechanics of mineralized collagen fibrils in bone. **Nature Communications**, v. 4, p. 1724–1729, 2013.
- NAYAK, A. K. Hydroxyapatite Synthesis Methodologies: An Overview. **International Journal of ChemTech Research**, v. 2, p. 903–907, 2010.
- NELSON, D. L.; COX, M. M. **Lehninger's Principles of Biochemistry**. 4. ed. [s.l.] W. H. Freeman, 2004.
- NETTO, C. G. Pesquisadores usam eletrólitos voláteis para facilitar a purificação de proteínas. **Jornal da UNICAMP**, p. 6, 31 mar. 2008.
- NIELSEN, P.M.; OLSEN, H. . Enzymic modification of food protein. In: **Enzymes in food technology**. [s.l.] Sheffield Academic Press, 2002. p. 109–143.
- NOVOZYMES. **Proteases for biocatalysis**. Disponível em: <https://www.novozymes.com/-/media/Project/Novozymes/Website/website/document-library/Advance-your-business/Pharma/Biocatalysis_brochure_Proteases.pdf>. Acesso em: 22 set. 2019.
- NOWAKOWSKI, A. B.; WOBIG, W. J.; PETERING, D. H. Native SDS-PAGE: High resolution electrophoretic separation of proteins with retention of native properties including bound metal ions. **Metallomics**, v. 6, n. 5, p. 1068–1078, 2014.
- OGAWA, M. et al. Biochemical Properties of Black Drum and Sheepshead Seabream Skin Collagen. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 51, n. 27, p. 8088–8092, 2003.
- OMIDI, M. et al. **Characterization of biomaterials**. [s.l.] Elsevier Ltd, 2017.
- OZAWA, M.; SUZUKI, S. Microstructural development of natural hydroxyapatite originated from fish-bone waste through heat treatment. **Journal of the American Ceramic Society**, v. 85, n. 5, p. 1315–1317, 2002.
- PAL, P. et al. Accelerating full thickness wound healing using collagen sponge of mrigal fish (*Cirrhinus cirrhosus*) scale origin. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 93, p. 1507–1518, 2016.
- PANYAM, D.; KILARA, A. Enhancing the functionality of food proteins by enzymatic modification. **Trends in Food Science and Technology**, v. 7, n. 4, p. 120–125, 1996.
- PARK, S. H.; JO, Y. J. Static hydrothermal processing and fractionation for

production of a collagen peptide with anti-oxidative and anti-aging properties. **Process Biochemistry**, v. 83, n. November 2018, p. 176–182, 2019.

PATI, F.; ADHIKARI, B.; DHARA, S. Isolation and characterization of fish scale collagen of higher thermal stability. **Bioresource Technology**, v. 101, n. 10, p. 3737–3742, 2010.

PEIXEBR. **Anuário PeixeBR da Piscicultura 2019**. Disponível em: <<https://www.peixebr.com.br/Anuario2019/AnuarioPeixeBR2019.pdf>>. Acesso em: 18 set. 2019.

PINTO, A. M. F. R.; OLIVEIRA, V. B.; FALCÃO, D. S. **Direct Alcohol Fuel Cells for Portable Applications**. 1. ed. Londres: Elsevier, 2018.

PIRES, A. L. R.; BIERHALZ, A. C. K.; MORAES, Â. M. Biomateriais: Tipos, aplicações e mercado. **Química Nova**, v. 38, n. 7, p. 957–971, 2015.

PON-ON, W. et al. Hydroxyapatite from fish scale for potential use as bone scaffold or regenerative material. **Materials Science and Engineering C**, v. 62, p. 183–189, 2016.

PRESTES, R. C. Colágeno e Seus Derivados: Características e Aplicações em Produtos Cárneos. **Revista Unopar Científica Ciências Biológicas e da Saúde**, v. 15, n. 1, p. 65–74, 2013.

PROCKOP, D. J. Collagens. In: **Encyclopedia of Biological Chemistry**. 2. ed. [s.l.] Academic Press, 2013. 1p. 545–549.

QIN, D. et al. Development and application of fish scale wastes as versatile natural. **Chemical Engineering Journal**, p. 131102, 2021.

RAJISHA, K. R. et al. Thermomechanical and spectroscopic characterization of natural fibre composites. **Interface Engineering of Natural Fibre Composites for Maximum Performance**, p. 241–274, 2011.

RAMAKRISHNAN, V. V. et al. Extraction of Proteins from Mackerel Fish Processing Waste Using Alcalase Enzyme. **Journal of Bioprocessing & Biotechniques**, v. 03, n. 02, 2013a.

RAMAKRISHNAN, V. V. et al. Extraction of Proteins from Mackerel Fish Processing Waste Using Alcalase Enzyme. **Journal of Bioprocessing & Biotechniques**, v. 03, n. 02, 2013b.

ROSA, M. F. et al. VALORIZAÇÃO DE RESÍDUOS DA AGROINDÚSTRIA. II **Simpósio Internacional sobre Gerenciamento de Resíduos Agropecuários e Agroindustriais**, v. I, p. 98–105, 2011.

SAMAVEDI, S.; WHITTINGTON, A. R.; GOLDSTEIN, A. S. Calcium phosphate ceramics in bone tissue engineering: A review of properties and their influence on cell behavior. **Acta Biomaterialia**, v. 9, n. 9, p. 8037–8045, 2013.

SANTOS, L. B. dos. **Escama de tilápia-do-Nilo: composição mineral, quantificação da hidroxiapatita de cálcio e caracterização de carbonato de cálcio do precipitado bruto Toledo**. 2016. Universidade Estadual do Oeste do Paraná, Toledo - PR, 2016.

SANTOS, E. B. et al. Caracterização de escamas do peixe piau (*Leporinus*

elongatus) e sua aplicação na remoção de Cu (II) de meio aquoso. **Química Nova**, v. 32, n. 1, p. 134–138, 2009.

SATHISKUMAR, S. et al. Green synthesis of biocompatible nanostructured hydroxyapatite from *Cirrhinus mrigala* fish scale – A biowaste to biomaterial. **Ceramics International**, v. 45, n. 6, p. 7804–7810, 2019.

SCHMIDT, M. M. et al. Collagen extraction process. **International Food Research Journal**, v. 23, n. 3, p. 913–922, 2016.

SCHRIEBER, R.; GAREIS, H. **Gelatine handbook: theory and industrial practice**. 1. ed. Alemanha: Wiley-VCH, 2007.

SIDDHARTHAN, A.; SESHADRI, S. K.; SAMPATH KUMAR, T. S. Microwave accelerated synthesis of nanosized calcium deficient hydroxyapatite. **Journal of Materials Science: Materials in Medicine**, v. 15, n. 12, p. 1279–1284, 2004.

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

SKIERKA, E.; SADOWSKA, M.; KARWOWSKA, A. Optimization of condition for demineralization Baltic cod (*Gadus morhua*) backbone. **Food Chemistry**, v. 105, n. 1, p. 215–218, 2007.

SMITH, A. I. **Peptide Characterization and Purification Using High-Performance Liquid Chromatography**. [s.l.] ACADEMIC PRESS, INC., 1993. v. 13

SPEIGHT, J. G. Industrial Organic Chemistry. In: **Environmental Organic Chemistry for Engineers**. 1. ed. Amsterdam: Butterworth-Heinemann, 2017. p. 87–151.

SRICHAROEN, P. et al. Ultrasonic-assisted recycling of Nile tilapia fish scale biowaste into low-cost nano-hydroxyapatite: Ultrasonic-assisted adsorption for Hg²⁺ removal from aqueous solution followed by “turn-off” fluorescent sensor based on Hg²⁺-graphene quantum dots. **Ultrasonics Sonochemistry**, v. 63, n. January, p. 104966, 2020.

SUBHAN, F. et al. A review on recent advances and applications of fish collagen. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 61, n. 6, p. 1027–1037, 2020.

TERZIOĞLU, P.; ÖĞÜT, H.; KALEMTAŞ, A. Natural calcium phosphates from fish bones and their potential biomedical applications. **Materials Science and Engineering C**, v. 91, p. 899-911, 2018.

TITUS, D.; JAMES JEBASEELAN SAMUEL, E.; ROOPAN, S. M. Nanoparticle characterization techniques. In: **Green Synthesis, Characterization and Applications of Nanoparticles**. [s.l.] Elsevier, 2019. p. 303–319.

UNEP. **Converting waste agricultural biomass into a resource**. Disponível em:

<https://wedocs.unep.org/bitstream/handle/20.500.11822/7614/WasteAgriculturalBiomassEST_Compndium.pdf?sequence=3&isAllowed=y>. Acesso em: 23 jun. 2021.

VENKATESAN, J. et al. A comparative study of thermal calcination and an alkaline hydrolysis method in the isolation of hydroxyapatite from *Thunnus obesus* bone. **Biomedical Materials**, v. 6, n. 3, 2011.

VILLANUEVA-ESPINOSA, J. F.; HERNÁNDEZ-ESPARZA, M.; RUIZ-TREVIÑO, F. A. Adsorptive properties of fish scales of *Oreochromis Niloticus* (Mojarra Tilapia) for metallic ion removal from waste water. **Industrial and Engineering Chemistry Research**, v. 40, n. 16, p. 3563–3569, 2001.

WALKER, W. F. JR; LIEM, K. F. **Functional anatomy of the vertebrates: an evolutionary perspective**. 2. ed. [s.l.] Fort Worth, 1994.

WANG, L. et al. Isolation and characterisation of collagens from the skin, scale and bone of deep-sea redfish (*Sebastes mentella*). **Food Chemistry**, v. 108, n. 2, p. 616–623, 2008.

ZAINOL, I. et al. Extraction of natural hydroxyapatite from tilapia fish scales using alkaline treatment. **Materials Today: Proceedings**, v. 16, p. 1942–1948, 2019.

ZHANG, F. et al. Preparation and Characterisation of Collagen from Freshwater Fish Scales. **Food and Nutrition Sciences**, v. 02, n. 08, p. 818–823, 2011.