



## Colágeno: características gerais e produção de peptídeos bioativos - uma revisão com ênfase nos subprodutos do pescado

### Collagen: general characteristics and production of bioactive peptides - a review with emphasis on byproducts of fish

Vagne de Melo Oliveira<sup>1</sup>; Márcia Nieves Carneiro da Cunha<sup>1</sup>; Thiago Pajeú Nascimento<sup>1</sup>; Caio Rodrigo Dias Assis<sup>2</sup>; Ranilson de Souza Bezerra<sup>2</sup> & Ana Lúcia Figueiredo Porto<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal, Universidade Federal Rural de Pernambuco - UFRPE

<sup>2</sup>Departamento de Bioquímica, Universidade Federal Pernambuco - UFPE

\*E-mail: analuporto@yahoo.com.br

Recebido: 7 de dezembro de 2016 / Aceito: 30 de maio de 2017 / Publicado: 29 de julho de 2017

**Resumo** Resíduos do processamento de pescado são fontes potenciais de biomoléculas proteicas de interesse industrial, tais como enzimas (colagenases, tripsina, quimotripsina e pepsina, por exemplo) e colágeno. O colágeno é uma proteína fibrosa de alto valor comercial. A maioria dos que foram isolados são de vertebrados, contudo, também já foram detectados em invertebrados marinhos como: medusas, lulas, pepinos-do-mar, corais, anêmonas-do-mar, entre outros. Atualmente, foram identificados 29 tipos distintos de família de colágeno em mamíferos, subdivididos em tipos fibrilares e colágenos não fibrilares. O colágeno do Tipo I é o mais abundante em peixes de água doce e marinhos, sendo extraído da pele, escamas, barbatanas, bexiga natatória, ossos, espinha e músculos e é amplamente utilizado para a área de engenharia de tecidos. Várias etapas são necessárias para o isolamento do colágeno a partir de fontes aquáticas. O pré-tratamento visa à remoção de sujidades e a separação de moléculas não colagenosas. O método de extração empregado dependerá do objetivo do isolamento, comumente sendo utilizados os métodos ácido-solúvel (ASC) e o pepsina-solúvel (PSC), ou uma combinação deles. Assim, esta revisão visa elencar as principais características do colágeno e sua aplicação industrial, com ênfase na produção de peptídeos bioativos para aplicações alimentícias, clínicas e farmacêuticas, além da aplicação na produção de biomateriais.

**Palavras-chave:** ácido-solúvel, biomaterial, biopolímero, pescado, pepsina-solúvel.

**Abstract** Residues from fish processing are potential sources of protein biomolecules of industrial interest, such as enzymes (collagenases, trypsin, chymotrypsin and pepsin, for example) and collagen. Collagen is a fibrous protein of high commercial value. Most of the isolates are from vertebrates, however, and have also been detected in marine invertebrates such as: jellyfish, squids, sea cucumbers, corals, sea anemones, among others. Currently, 29 distinct types of collagen family have been identified in mammals, subdivided into fibrillary types and non-fibrillar collagens. Type I collagen is the most abundant in freshwater and marine fish, being extracted from the skin, scales, fins, swimming bladder, bones, spine and fish muscles, and is widely used in the field of tissue engineering. Several steps are required for the isolation of collagen from aquatic sources. The pre-treatment aims at the removal of soils and the separation of non-collagenous molecules. The method of extraction used will depend on the objective of the isolation, commonly using the methods acid-soluble (ASC) and pepsin-soluble (PSC), or a combination of them. Thus, this review ellipses the main characteristics of collagen and emphasizes its industrial application, with emphasis on the production of bioactive peptides for food, clinical and pharmaceutical applications, as well as the application in the production of biomaterials.

**Keywords:** acid-soluble, biomaterial, biopolymer, fish, pepsin-soluble.

Trabalho financiado pela Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia de Pernambuco - Facepe.

## Introdução

O pescado é considerado um produto valioso por conter elevado teor de proteína bruta de alta qualidade e que são facilmente digeridas (Cho, Jin, Rha, Kim & Hwang, 2014), por apresentar todos os aminoácidos e gorduras essenciais (por exemplo, ácidos graxos de cadeia longa), vitaminas (D, A e B) e minerais (incluindo cálcio, iodo, zinco, ferro e selênio), particularmente se consumido inteiro (FAO, 2016). Em paralelo ao aumento do consumo de pescado se tem uma variedade de resíduos sólidos gerados pela indústria de processamento, tais como cabeça, cauda, escamas, barbatanas, bexiga natatória, cartilagens, vísceras e pele (Oliveira et al., 2017a; 2017b), representando mais de 50% do peso do animal e se tornando um prejuízo ambiental e econômico quando descartado inadequadamente (Ferraro, Anton & Santé-Lhoutellier, 2016). Assim, o aproveitamento destes resíduos surge à alternativa para extração de biomoléculas, como colágeno, collagenases, pepsina, tripsina, quimotripsina (Masilamani, Madhan, Shanmugam, Palanivel & Narayan, 2016; Oliveira et al., 2017a; 2017b).

O colágeno é um produto de alto valor e tem sido fonte de investigação para uso industrial devido à sua abundância no tecido animal (bovinos, suínos, caprinos, ovinos, peixes, anfíbios, entre outros) (Fauzi, Lokanathan, Aminuddin, Ruszymah & Chowdhury, 2016; Masilamani, Madhan, Shanmugam, Palanivel & Narayan, 2016; Krishnamoorthi, Ramasamy, Shanmugam & Shanmugam, 2017). Dentre os vários organismos utilizados para obtenção de colágeno destacam-se os peixes, especialmente devido a sua disponibilidade, ausência de risco de transmissão de doenças, barreiras religiosas, alto rendimento no processo de extração e ausência de toxicidade (Senaratne, Park & Kim, 2006; Krishnamoorthi, Ramasamy, Shanmugam & Shanmugam 2017).

Os diferentes tipos de colágeno diferem em termos de organização molecular, estabilidade, elasticidade, antigenicidade e imunogenicidade, afetando na funcionalidade do tecido manipulado (Lynn, Yannas & Bonfield, 2004; Gómez-Guillén, Giménez, López-Caballero & Montero, 2011; Chang & Buehler, 2014; Fauzi, Lokanathan, Aminuddin, Ruszymah & Chowdhury, 2016; An, Lin & Brodsky, 2016; Ferraro, Anton & Santé-Lhoutellier, 2016; Elango et al., 2017). Diante a introdutória acima, esta revisão elenca as principais características do colágeno e dá ênfase a sua aplicação industrial na produção de peptídeos bioativos.

## Estrutura do Colágeno

O colágeno, a mais abundante proteína de mamíferos, representa cerca de 20-30% do total de proteínas corporais (Zeugolis & Raghunath, 2011) e constitui o principal elemento estrutural de órgãos e tecidos de vertebrados (Senaratne, Park & Kim, 2006; Uitto, Chu, Gallo & Eisen, 2008; Gelse, Pöschl & Aigner, 2003; Chung & Uitto, 2010). Já tendo sido detectado em invertebrados, como medusas, lulas, pepinos-do-mar, corais e anêmonas-do-mar (Zeugolis & Raghunath, 2011; Siddiqui et al., 2013; Jankangram, Chooluck & Pomthong, 2016).

As fibrilas de colágeno são formadas pela polimerização de unidades moleculares alongadas denominadas tropocolágeno, consistindo em três subunidades (cadeias polipeptídicas) arranjadas em tríplice hélice (Junqueira & Carneiro, 2013), unidas por pontes de hidrogênio (Gelse, Pöschl & Aigner, 2003; Ferreira, Gentile, Chiono & Ciardelli, 2012). A influência na estabilização da hélice de colágeno é também devido a pequenas interações químicas, tais como: Van der Waals, hidrofóbica e eletrostática (Prestes, 2013). Todos os membros da família tem uma sequência repetitiva, nomeadamente a [Gly-X-Y]<sub>n</sub>. A posição X é comumente ocupada por prolina (Pro), enquanto a posição Y é muitas vezes ocupada por hidroxiprolina (Hyp). Esta última representa uma modificação pós-traducional. O resíduo de glicina é pré-requisito estrutural para a tripla hélice (Gelse, Pöschl & Aigner, 2003; Daboor, Budge, Ghaly, Brooks & Dave, 2010; Zeugolis & Raghunath, 2011; Ferreira, Gentile, Chiono & Ciardelli, 2012).

## Tipos e Distribuição Tecidual

Até o presente momento, foram identificados 29 tipos genéticos distintos de colágeno, muitos dos quais com características únicas e alguns com características inter-relacionadas; contudo, todos sendo formados por subunidades polipeptídicas designadas de cadeias (Chung & Uitto, 2010; Zeugolis & Raghunath, 2011; Fauzi, Lokanathan, Aminuddin, Ruszymah & Chowdhury, 2016). Nove deles são frequentemente disponíveis, incluindo os colágenos dos Tipos I, II, III, IV, V, VII, IX, XI e XII (Fauzi, Lokanathan, Aminuddin, Ruszymah & Chowdhury, 2016) e podem ser dividido em tipos fibrilares e colágenos não fibrilares. Os tipos fibrilares I, II e III formam fibrilas de colágeno típicas com uma

periodicidade axial de 67 nm e são os colágenos mais abundantes (An, Lin & Brodsky, 2016). A Tabela 1 ilustra os tipos e a distribuição tecidual do colágeno no organismo de mamíferos.

**Tabela 1** Principais tipos de colágeno e distribuição tecidual.

<b>Tipo</b>	<b>Composição molecular</b>	<b>Distribuição tecidual</b>
<i>Colágeno formadores de fibrilas</i>		
I	$[\alpha 1(I)]_2\alpha 2(I)$	Pele, tendão, osso, dentina.
II	$[\alpha 1(II)]_3$	Cartilagem, corpo vítreo, núcleo pulposos.
III	$[\alpha 1(III)]_3$	Pele, parede dos vasos, fibras reticulares da maioria dos tecidos.
V	$\alpha 1(V), \alpha 2(V), \alpha 3(V)$	Pulmão, córnea, ossos, tecidos fetais; juntamente com o colágeno tipo I.
XI	$\alpha 1(XI) 2(XI)\alpha 3(XI)$	Cartilagem, corpo vítreo.
<i>Colágeno da membrana basal</i>		
IV	$[\alpha 1(IV)]_2\alpha(IV); \alpha 1- \alpha 6$	Membranas basais.
<i>Colágeno microfibrilar</i>		
VI	$\alpha 1(VI), \alpha 2(VI), \alpha 3(VI)$	Derme, cartilagem, placenta, pulmões, da parede do vaso, disco intervertebral.
<i>Fibrilas de ancoragem</i>		
VII	$[\alpha 1(VII)]_3$	Pele, junções epidérmicas, cérvix.
<i>Colágenos formadores de rede hexagonal</i>		
VIII	$[\alpha 1(VIII)]_2\alpha 2(VIII)$	Células endoteliais.
X	$[\alpha 3(X)]_3$	Cartilagem hipertrófica.
<i>Colágenos FACIT</i>		
IX	$\alpha 1(IX)\alpha 2(IX)\alpha 3(IX)$	Cartilagem, humor vítreo, córnea.
XII	$[\alpha 1(XII)]_3$	Pericôndrio, ligamentos, tendões.
XIV	$[\alpha 1(XIV)]_3$	Derme, tendão, da parede do vaso, placenta, pulmões, fígado.
XIX	$[\alpha 1(XIX)]_3$	Rabdomiossarcoma humano.
XX	$[\alpha 1(XX)]_3$	Epitélio da córnea, pele embrionária, cartilagem esternal, tendão.
XXI	$[\alpha 1(XXI)]_3$	Parede de vasos sanguíneos.
<i>Colágenos transmembranares</i>		
XIII	$[\alpha 1(XIII)]_3$	Epiderme, endomísio, intestino, condrócitos, pulmões, fígado.
XVII	$[\alpha 1(XVII)]_3$	Junções derme-epidérmicas.
<i>Multiplexin</i>		
XV	$[\alpha 1(XV)]_3$	Fibroblastos, células musculares lisas, rim, pâncreas.
XVI	$[\alpha 1(XVI)]_3$	Fibroblastos, queratinócitos.
XVIII	$[\alpha 1(XVIII)]_3$	Pulmões, fígado, timo, músculo, intestino, pele.

Fonte: Adaptado de Gelse, Pöschl & Aigner (2003).

O colágeno do Tipo I é o biopolímero mais abundante no corpo de mamíferos, sendo vastamente utilizadas na área de engenharia de tecidos para produção de biomateriais devido à sua excelente biocompatibilidade e propriedades biodegradáveis, ajudando a compor ossos, dentina, tendões, cápsulas de órgãos, córnea, vasos sanguíneos e derme, além de desempenharem um papel importante na morfogênese e no metabolismo celular de novos tecidos, conferindo propriedades mecânicas e bioquímicas (Myllyharju & Kivirikko, 2004; Söderhäll et al., 2007; Uitto, Chu, Gallo & Eisen, 2008; Chung & Uitto, 2010; Zeugolis & Raghunath, 2011; Ferreira, Gentile, Chiono & Ciardelli, 2012; Makareeva & Leikin, 2014).

O domínio central de cada uma das três cadeias contém um segmento de repetição ininterrupta Gli-X-Y abrangendo cerca de 1000 aminoácidos (Daboor, Budge, Ghaly, Brooks & Dave, 2010; Chung & Uitto, 2010; Junqueira & Carneiro, 2011; Makareeva & Leikin, 2014). O colágeno tipo I pode existir como heterotrímero, ou seja, uma macromolécula constituída de três cadeias polipeptídicas (duas  $\alpha 1$  e uma  $\alpha 2$ )

que estão sob a forma helicoidal em sua porção central e nas extremidades amínica e carboxílica permanecem na forma globular (Zeugolis & Raghunath, 2011; Prestes, 2013; An, Lin & Brodsky, 2016). O colágeno Tipo I é sintetizado como um precursor de procolágeno, o qual é composto de um pró-peptídeo N-terminal, domínio de colágeno central e de pró-peptídeo C-terminal (Makareeva & Leikin, 2014). Em outros colágenos, como nos Tipos IV (o colágeno da membrana basal) e VII (o colágeno de ancoragem das fibrilas), a sequência de repetições Gli-X-Y contém imperfeições que interrompem a conformação em tripla hélice (Uitto, Chu, Gallo & Eisen, 2008; Chung & Uitto, 2010).

Os colágenos Tipos I, II, III, V, X, XXIV e XXVII alinham-se em grandes fibrilas extracelulares e são designados como colágenos formadores de fibrilas ou colágenos fibrilares (Zeugolis & Raghunath, 2011). O colágeno Tipo IV é organizado em um entrelaçamento dentro das membranas basais, enquanto o Tipo VI forma microfibrilas distintas e o Tipo VII forma fibrilas de ancoragem (Olsen, 1995; Teruel, 1997; Uitto, Chu, Gallo & Eisen, 2008; Chung & Uitto, 2010; ). Colágenos associados às fibrilas são estruturas curtas que ligam as fibrilas de colágeno umas às outras e os outros componentes da matriz extracelular, pertencendo a este grupo os colágenos dos Tipos IX, XII, XIV, XIX, XX e XXI (Olsen, 1995; Teruel, 1997; Uitto, Chu, Gallo & Eisen, 2008; Chung & Uitto, 2010). O colágeno do Tipo XXVIII já foi expresso no fígado, timo, músculo, intestino e pele de espécies de peixes (Gebauer, Kobbe, Paulsson & Wagener, 2015). A abundância dos Tipos V e XI são baixas, mas eles são encontrados associados com os Tipos I e II, no osso e na cartilagem, bem como em outros tecidos, com importante participação na função de resistência à tensão (Daboor, Budge, Ghaly, Brooks & Dave, 2010; Junqueira & Carneiro, 2011).

A derme humana é composta por colágenos dos Tipos I e III associados em fibras extracelulares, representando 80% e 10% do volume total de colágeno, respectivamente. Outro colágeno presente na pele é o Tipo IV, presente na junção dermo-epidérmica e na membrana basal vascular. Em adição a estes grandes colágenos, a pele humana contém vários colágenos menores que demonstram localização espacialmente restringida, contudo desempenham um papel crítico na estabilidade da pele. Um deles é colágeno Tipo VII, o principal, se não exclusivo, componente das fibrilas de ancoragem, que interage com o colágeno do tipo I (Chung & Uitto, 2010; Junqueira & Carneiro, 2013).

Em espécies de peixes marinhos e de água doce, o colágeno do Tipo I pode ser isolado a partir da pele, escamas, barbatanas, bexiga natatória, ossos, espinha e músculos (Liu, Liang, Regenstein & Zhou, 2012; Muralidharan, Shakila, Sukumar & Jeyasekaran, 2013; Di, Chang-Feng, Bin, Guo-Fang & Zhong-Rui, 2014; Kozłowska, Sionkowska, Skopinska-Wisniewska & Piechowicz, 2015; Tang et al., 2015; Chen et al., 2016a; 2016b; Krishnamoorthi, Ramasamy, Shanmugam & Shanmugam, 2017; Pal & Suresh, 2017). Colágeno do Tipo I extraído de pés de aves, pele bovina, pele do sapo, pele suína e pele de tubarão diferem quanto à composição de aminoácidos. O colágeno das aves apresentar uma maior concentração de ácido glutâmico (Glu) e ácido aspártico (Asp), enquanto que o colágeno da pele de tubarão possui menor quantidade de ácido aspártico e hidroxiprolina (Hyp) (Lin & Liu, 2006).

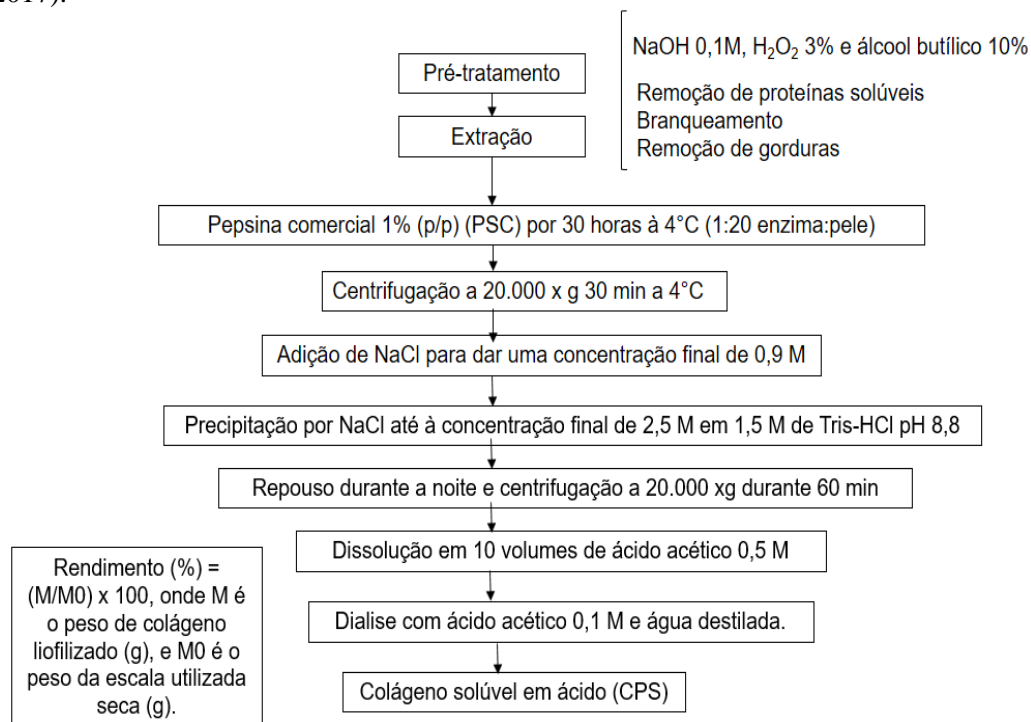
## Extração e Rendimento

O colágeno pode ser isolado através de diferentes métodos de extração (sal neutro ou alcalino, ácido acético, ácido propiônico e enzimático), embora a predileção seja pelos métodos ácido e enzimático (Zeugolis & Raghunath, 2011; Masilamani, Madhan, Shanmugam, Palanivel & Narayan, 2016; Krishnamoorthi, Ramasamy, Shanmugam & Shanmugam, 2017) ou uma combinação desses para fins de aumentar a eficácia da extração, e com isso, um ganho maior no rendimento final (Muralidharan, Shakila, Sukumar & Jeyasekaran, 2013; Fauzi, Lokanathan, Aminuddin, Ruszymah & Chowdhury, 2016).

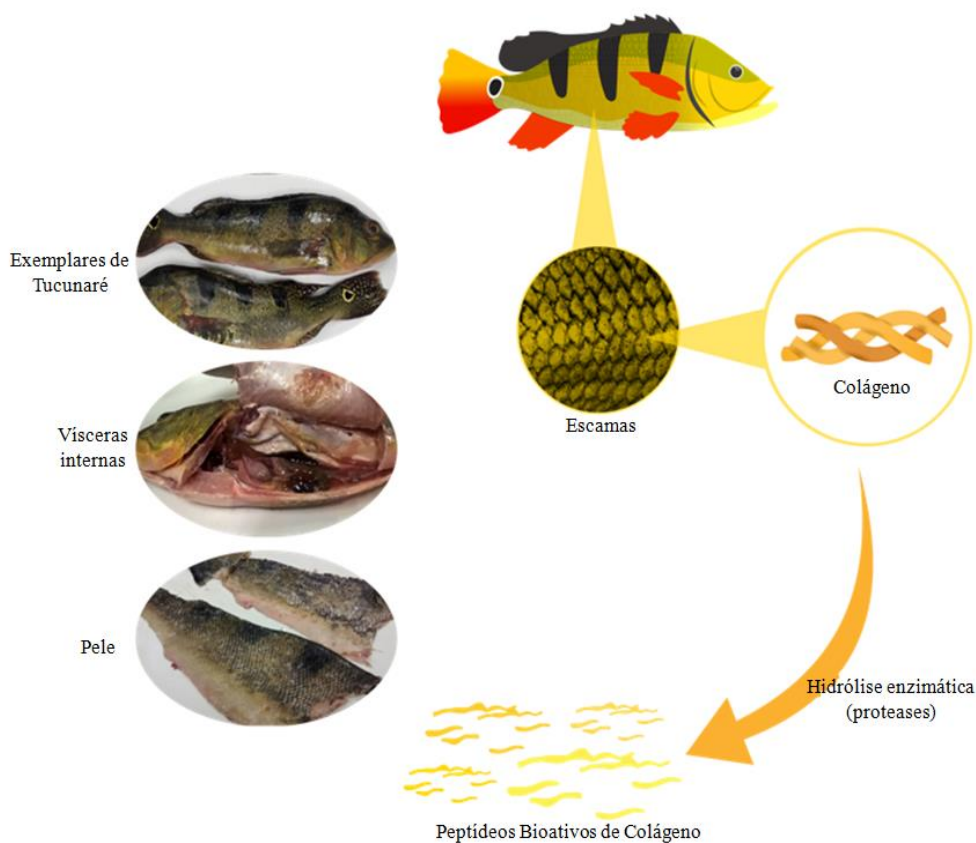
A extração ácida e alcalina é mais laboriosa, ao requerer temperaturas mais elevadas (até 75°C), além de longos períodos; enquanto que a ácida e enzimática é caracterizada por um período extensivo para obter colágenos (até 192 h) e vários reagentes químicos, tais como NaOH, ácido acético, pepsina e NaCl (Huang, Kuo, Wu & Tsai, 2016). O objetivo do pré-tratamento é remover gordura, cálcio e o máximo de impurezas sem que haja desnaturação proteica. A purificação pode ser realizada através de precipitação salina, diálise e métodos cromatográficos (Zeugolis & Raghunath, 2011). Os métodos de extração podem vir a ser também de certo custo e, por vezes, prejudiciais ao meio ambiente (Huang, Kuo, Wu & Tsai, 2016). As Figuras 1 e 2 ilustram um fluxograma de extração de colágeno de tucunaré *Cichla ocellaris* e a remoção de pele e escamas para posterior processo de pré-tratamento, respectivamente.

Várias espécies de peixes já foram objeto de extração de colágeno, tais como *Nemipterus hexodon* (Nalinanon, Benjakul, Kishimura & Osako, 2011), *Pangasianodon hypophthalmus* (Singh, Benjakul, Maqsood & Kishimura, 2011), *Evenchelys macrura* (Veerurajet al., 2013), *Lates niloticus* (Muyonga, Cole & Duodu, 2004), *Raja kenojei* (Hwang, Mizuta, Yokoyama & Yoshinaka, 2007), *Paralichthys*

*olivaceus*, *Sebastes schlegeli*, *Lateolabrax maculatus* e *Pagrus major* (Cho, Jin, Rha, Kim & Hwang, 2014), *Doryteuthis singhalensis* (Veeruraj et al., 2015), *Esox lucius* (Kozłowska, Sionkowska, Skopinska-Wisniewska & Piechowicz, 2015) e de *Sepia pharaonis* (Krishnamoorthi, Ramasamy, Shanmugam & Shanmugam, 2017).



**Figura 1** Fluxograma de extração de colágeno de pele de peixe por método pepsino-solúvel. Adaptado de Singh, Benjakul, Maqsood & Kishimura (2011).



**Figura 2** Retirada da pele e escamas de tucunaré *Cichla ocellaris* para etapas de pré-tratamento. Fonte: Acervo pessoal.

A Tabela 2 descreve o método de extração e rendimento do colágeno de peixes. O rendimento de extração e recuperação de colágeno pode variar de acordo com a espécie devido as diferentes ligações cruzadas de fibrilas de colágeno (Senaratne, Park & Kim, 2006; Kaewdang, Benjakul, Kaewmanee & Kishimura, 2014), oscilando entre 0,43% (Thuy et al., 2014) e 92,2% (Wang et al., 2007).

**Tabela 2** Rendimento de extração de colágeno de diferentes tecidos de peixes.

Espécies	Tecido	Método de extração*	Rendimento (%)	Referências
<i>Sebastes mentella</i>	Pele	PSC	92,2	Wang et al. (2007)
<i>Chiloscyllium punctatum</i>	Pele	ASC	9,38	Kittiphattanabawon et al. (2010a)
<i>Chiloscyllium punctatum</i>	Pele	PSC	8,36	Kittiphattanabawon et al. (2010a)
<i>Carcharhinus limbatus</i>	Cartilagem	ASC	1,04	Kittiphattanabawon et al. (2010b)
<i>Hypophthalmichthys nobilis</i>	Escama	PSC	2,7	Liu et al. (2012)
<i>Hypophthalmichthys nobilis</i>	Ossos	PSC	2,9	Liu et al. (2012)
<i>Hypophthalmichthys nobilis</i>	Bexiga	PSC	59,0	Liu et al. (2012)
<i>Hypophthalmichthys nobilis</i>	Barbatanas	PSC	5,1	Liu et al. (2012)
<i>Rachycentron canadum</i>	Pele	ASC	35,5	Zeng et al. (2012)
<i>Rachycentron canadum</i>	Pele	PSC	12,3	Zeng et al. (2012)
<i>Istiophorus platypterus</i>	Pele	PSC	2,11	Tamilmozhi et al. (2013)
<i>Istiophorus platypterus</i>	Pele	ASC	5,76	Tamilmozhi et al. (2013)
<i>Lates calcarifer</i>	Pele	ASC	15,8	Sinthusamran et al. (2013)
<i>Lates calcarifer</i>	Bexiga	ASC	28,5	Sinthusamran et al. (2013)
<i>Mugil cephalis</i>	Escamas	ASC	0,43	Thuy et al. (2014)
<i>Katsuwonus pelamis</i>	Espinha	ASC	2,47	Di et al. (2014)
<i>Katsuwonus pelamis</i>	Crânio	PSC	6,71	Di et al. (2014)
<i>Thunnus albacares</i>	Bexiga	ASC	1,07	Kaewdang et al. (2014)
<i>Thunnus albacares</i>	Bexiga	PSC	12,10	Kaewdang et al. (2014)
<i>Saurida spp. (Japão)</i>	Escama	ASC	0,79	Thuy et al. (2014)
<i>Saurida spp. (Vietnam)</i>	Escama	ASC	0,69	Thuy et al. (2014)
<i>Mugil cephalis</i>	Escama	ASC	0,43	Thuy et al. (2014)
<i>Cypselurus melanurus</i>	Escama	ASC	0,72	Thuy et al. (2014)
<i>Dentex tumifrons</i>	Escama	ASC	0,90	Thuy et al. (2014)
<i>Brama australis</i>	Pele	ASC	1,5	Sionkowska et al. (2015)
<i>Doryteuthis singhalensis</i>	Pele	ASC	56,80	Veeruraj et al. (2015)
<i>Doryteuthis singhalensis</i>	Pele	PSC	24,60	Veeruraj et al. (2015)
<i>Oreochromis niloticus</i>	Pele	PSC	21,8	Zhang et al. (2016)
<i>Ictalurus punctatus</i>	Pele	ASC	25,90	Zhang et al. (2016)
<i>Ictalurus punctatus</i>	Pele	PSC	28,80	Zhang et al. (2016)
<i>Oreochromis niloticus</i>	Escama	ASC	3,2	Chen et al. (2016a)
<i>Cyprinus carpio</i>	Escama	ASC	9,79	Bhagwat & Dandge (2016)
<i>Catla catla</i>	Escama	PSC	1,48	Pal & Suresh (2017)
<i>Labeo rohita</i>	Escama	ASC	2,7	Pal & Suresh (2017)
<i>Labeo rohita</i>	Escama	PSC	2,26	Pal & Suresh (2017)
<i>Sepia pharaonis</i>	Pele	ASC	1,66	Krishnamoorthi et al. (2017)
<i>Sepia pharaonis</i>	Pele	PSC	3,93	Krishnamoorthi et al. (2017)

\*ASC - Método Ácido-Solúvel. PSC - Método Pepsina-Solúvel.

O rendimento de extração dos colágenos pepsina-solúvel (PSC) ainda pode variar de acordo com a fonte enzimática, como reportada por Ahmad & Benjakul (2010) para *Aluterus monoceros*. Os autores obtiveram rendimentos de 8,48% e 7,56% ao empregar pepsina de albacora e pepsina suína, respectivamente. Combinações entre métodos foram relatadas por Jamilah, Umi Hartina, Mat Hashim & Sazili (2013) para o isolamento de colágeno de *Lates calcarifer*. Os autores detectaram rendimentos de 8,1%, 43,6% e 44,0% para extrações utilizando ácido, pepsina e papaína, respectivamente, sugerindo que além do ácido e da pepsina, a papaína pode ser utilizada como alternativa no barateamento da produção. Os dados apresentados na Tabela 2 evidenciam a viabilidade do emprego de enzimas das próprias espécies aquáticas. Todavia, a eficácia da pepsina na extração de colágeno pode depender da espécie de peixe estudada, da composição e configuração de colágeno, e da quantidade e fontes da pepsina usadas (Di, Chang-Feng, Bin, Guo-Fang & Zhong-Rui, 2014). Após a etapa de extração e purificação, são realizadas análises físico-químicas para avaliar a pureza do colágeno, através de métodos que levem e confirmem a estrutura, a massa molecular e a

solubilidade da proteína em questão (Zeugolis & Raghunath, 2011; Krishnamoorthi, Ramasamy, Shanmugam & Shanmugam 2017).

## Hidrólise do Colágeno

As fibrilas de colágeno são insolúveis na sua estrutura nativa, mas podem ser solubilizadas em solução aquosa se forem desnaturadas para procolágeno solúvel (Ferreira, Gentile, Chiono & Ciardelli, 2012). A tripla hélice de colágeno nativo é altamente resistente à ação da maioria das proteases. Entretanto, a ação da colagenase torna a molécula do colágeno um alvo fácil para outras enzimas proteolíticas, uma vez que, as células de tecido conjuntivo sintetizam uma série de proteases capazes de atuar sobre o colágeno em condições fisiológicas. Este grupo de proteases incluem metalo, aspártico, cisteíno e serino proteases, como a quimotripsina e a tripsina (Teruel, 1997; Oliveira et al., 2017b).

Assim, para a preparação de peptídeos, emprega-se a clivagem química utilizando brometo de cianogênio como catalisador. Deste modo, enzimas com propriedades colagenolíticas, que apresentam elevada atividade, especificidade e são estáveis, mostram-se as preferidas para a produção desses fragmentos (Teruel, 1997; Watanabe, 2004; Uesugi, Arima, Usuki, Iwabuchi & Hatanaka, 2008).

As metalocolagenases desempenham um papel crítico, dentre todos os tipos de colagenases, na produção destes peptídeos, clivando todo colágeno fibroso, de forma mais rápida nos Tipos I e III, do que nos do Tipo II. A ação deste tipo de colagenase é dependente da conformação, sob a tripla hélice de colágeno em um local definido, entre os resíduos de Gly-Ile ou Gly-Leu ou ligações em todas as três cadeias peptídicas. Contudo, metalocolagenases apresentam pouca ação no mesmo local em cadeias  $\alpha$  individuais. Essas colagenases não possuem efeito sobre a parte não fibrosa dos colágenos. A degradação do colágeno requer a ação conjunta de colagenases verdadeiras e de pelo menos mais uma protease (tripsina, quimotripsina, papaína, bromelina, entre outras) sobre os diferentes locais da molécula de colágeno (Teruel, 1997; Ferraro, Anton & Santé-Lhoutellier, 2016; Oliveira et al., 2017b).

A clivagem do colágeno por colagenases leva a formação de peptídeos. “Peptídeos de colágeno” é o termo que designa os fragmentos formados a partir da hidrólise do colágeno (Lima et al., 2013; Oliveira et al., 2017a; 2017b). O termo “bioativo” é muitas vezes empregado à medida que esses fragmentos acabam por apresentar propriedades biológicas que contribuem nas funções fisiológicas do organismo, como ingestão e absorção dos aminoácidos (Gómez-Guillén, Giménez, López-Caballero & Montero, 2011; Choonpicharn, Jaturasitha, Rakariyatham, Suree & Niamsup, 2015; Jeevithan, Bao, Zhang, Hong & Wu, 2015). Esses compostos bioativos têm sido referidos como sendo agentes eficazes no tratamento da artrite e servindo de proteção contra bactérias patogênicas. Esses peptídeos têm sido administrados por via oral como um pré-tratamento contra a osteoporose (Watanabe, 2004).

## Colágeno e Produção de Peptídeos Bioativos: Aplicações Industriais

Biopolímeros produzidos a partir do colágeno tem sido utilizado na produção de materiais com aplicações biomédicas por ser capaz de com as células através de domínios específicos de reconhecimento (Pires, Bierhalz & Moraes, 2015). É o principal componente da matriz extracelular, orientando e estimulando a formação tecidual. Ainda, somam-se a abundância, biocompatibilidade, estabilidade, alta porosidade, facilidade de combinação com outros materiais, processamento fácil, baixa antigenicidade e capacidade de absorção no corpo, tornando essa proteína preferida para a produção de biomateriais de diferentes formas e aplicações (Pati, Dhara & Adhikari 2010; Ferreira, Gentile, Chiono & Ciardelli, 2012; An, Lin & Brodsky, 2016; Fauzi, Lokanathan, Aminuddin, Ruszymah & Chowdhury, 2016), como membranas e esponjas para revestimento de queimaduras, géis para hemostasia e suporte para o crescimento de células. O colágeno também interage com enzimas envolvidas na sua biossíntese e degradação. Esse biopolímero pode ser atrelado a outros compostos com a finalidade de aumentar a resistência mecânica do biomaterial, como quitosana, gelatina, alginatos e oligossacarídeos (Ferreira, Gentile, Chiono & Ciardelli, 2012; Chandika et al., 2015; Pires, Bierhalz & Moraes, 2015; An, Lin & Brodsky, 2016; Kuttappan, Mathew & Nair, 2016).

Colágenos isolados ou associados a outros compostos podem constituir matéria-prima para a produção de suturas, agentes hemostáticos, substituição e/ou regeneração tecidual (vasos, ossos, cartilagens, pele, sangue, traqueia, esôfago), cirurgia plástica (lábios, pele), oxigenador de membrana, contraceptivos, matrizes biodegradáveis, implantes, bandagem da córnea, lentes de contato (Ferreira, Gentile, Chiono & Ciardelli, 2012). A Tabela 3 descreve as principais fontes de colágeno e de seus fragmentos empregados para aplicações industriais.

Na indústria de processamento alimentício, o colágeno e/ou seus fragmentos peptídicos podem ser utilizados na preparação de alimentos e bebidas, com a finalidade de melhorar a elasticidade, consistência e estabilidade dos produtos, aumentando o valor de qualidade, nutrição e saúde dos produtos. Peptídeos bioativos a partir do colágeno de peixes podem ser utilizados na preparação de bebidas probióticas (Hashim, Mohd Ridzwan, Bakar & Mat Hashim, 2015).

**Tabela 3** Colágeno, peptídeos e suas aplicações industriais.

Fonte proteica	Aplicação biotecnológica	Referência
Escama de peixe	Colite Ulcerativa	Azuma et al. (2014)
Cartilagem de tubarão	Antioxidante	Jeevithan et al. (2015)
Pele de peixe	Anti-hipertensivo e Antioxidante	Choonpicharn et al. (2015)
Pele de peixe	Neuroprotetor e Antioxidante	Cai et al. (2015)
Pele de peixe	Regeneração Tecidual	Chandika et al. (2015)
Pele de peixe	Produção de Biofilmes	Tang et al. (2015)
Pele de peixe	Esponja regenerativa	Yamamoto et al. (2015)
Hidrolisado de peixe*	Antibacteriano	Ennaas et al. (2016)
Escama de peixe	Fertilizantes nitrogenados para plantas	Bhagwat & Dandge (2016)
Colágeno humano	Enxerto Corneano	Flavahan et al. (2016)
Escama de peixe	Condrogênese	Hsu et al. (2016)
Colágeno Tipo I**	Tratamento tumoral	Voicu et al. (2016)
Colágeno humano	Diverticulites	Brown et al. (2017)
Pele de peixe	Produção de Biofilmes	Elango et al. (2017)
Escama de peixe	Antioxidante	Pal & Suresh (2017)

\*Peptídeo isolado do hidrolisado. \*\*Colágeno comercial.

O colágeno influencia no retardamento da taxa de desnaturação proteica quando adicionado a proteínas miofibrilares do músculo (Darmanto, Agustini, Swastawati & Al Bulushi, 2014). Tang et al. (2015) reportaram diferenças de viscosidade do colágeno extraído da pele de três espécies de peixes de água doce (*Oreochromis niloticus*, *Ctenopharyngodon idella* e *Hypophthalmichthys molitrix*), influenciando na produção de biofilmes. Assim, o colágeno extraído de peixes de água doce é sugestivo para uso na conservação de alimentos.

Os peptídeos que mostram atividade biológica são sequências de 2-30 aminoácidos, que são inativos dentro da cadeia proteica, porém exercem efeitos positivos quando são liberados durante a digestão gastrointestinal, processamento de alimentos enzimáticos ou fermentação microbiana. Numerosas vias fisiológicas podem ser moduladas quando os peptídeos atingem a corrente sanguínea (Ferraro, Anton & Santé-Lhoutellier, 2016).

Peptídeos de colágeno baseados em alimentos são detectáveis no sangue após a ingestão (Azuma et al., 2014). Iwai et al. (2005) identificaram vários peptídeos de colágeno derivados de alimentos no sangue humano após ingestão oral de alguns hidrolisados de gelatina a partir da pele suína, pé de galinha e cartilagem após 12 h de jejum. Os autores relataram que após a ingestão oral a forma peptídica da hidroxiprolina (Hyp) aumentou significativamente, atingindo nível máximo (20-60 nmol/mL de plasma) após 1-2 h, e reduzindo pela metade após 4 h de consumo. Ainda, quantidades significativas dos peptídeos Pro-Hyp, Pro-Hyp-Gly, Ala-Hyp, Ala-Hyp-Gly, Ser-Hyp, Ser-Hyp-Gly, Leu-Hyp, Ile-Hyp e PheHyp também foram detectados.

Peptídeos bioativos são capazes de eliminar radicais livres, prevenir a oxidação lipídica e atuar como quelante para metais de transição (Ferraro, Anton & Santé-Lhoutellier, 2016), bem como atuar como agente antimicrobiano, antioxidante, anti-hipertensivo, antiproliferativas, antidiabético, antitrombótica, agonista de opióides, anticancerígeno e anticoagulante (Kim & Venkatesan, 2014; Ennaas et al., 2016; Ferraro, Anton & Santé-Lhoutellier, 2016).

## Considerações Finais

Resíduos do pescado são fontes ricas em biomoléculas, destacando-se o colágeno, um biopolímero que apresentar algumas vantagens, como ausência de transmissão de patógenos, preocupação das fontes atuais (bovinos, suínos, entre outros), ausência de citotoxicidade e abundância.

O colágeno do Tipo I é o mais abundante e altamente desejado devido as suas propriedades físico-químicas e mecânicas, tornado-se alvo para a produção de biomateriais para uso na engenharia de tecidos e



de alimentos. A hidrólise do colágeno leva a formação de peptídeos que podem apresentar propriedades antimicrobianas, antioxidantes, anti-hipertensivas, antiproliferativas, antidiabéticas, antitrombóticas, agonista de opióides, anticancerígena e anticoagulante. Assim, é sugestiva a realização de novas extrações a partir das espécies de peixes Neotropicais (de água doce e marinha) na tentativa de investigar fontes alternativas, com qualidade comercial do ponto de vista físico-químico. Além do que, são necessários testes antialérgicos para garantir a segurança na aplicação deste material.

## Referências

- Ahmad, M. & Benjakul, S. (2010). Extraction and characterisation of pepsin-solubilised collagen from the skin of unicorn leatherjacket (*Aluterus monoceros*). *Food Chemistry*, 120: 817-824.
- An, B., Lin, Y-S. & Brodsky, B. (2016). Collagen interactions: Drug design and deliver. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 97: 69-84.
- Azuma, K., Osaki, T., Tsuka, T., Imagawa, T., Okamoto, Y. & Minami, S. (2014). Effects of fish scale collagen peptide on an experimental ulcerative colitis mouse model. *PharmaNutrition*, 2: 161-168.
- Bhagwat, P.K. & Dandge, P.B. (2016). Isolation, characterization and valorizable applications of fish scale collagen in food and agriculture industries. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 7: 234-240.
- Brinckerhoff, C.E. & Matrisian, L.M. (2002). Matrix metalloproteinases: a tail of a frog that became a prince. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 3: 207-214.
- Brown, S.R., Cleveland, E.M., Deeken, C.R., Huitron, S.S., Aluka, K.J. & Davis, K.G. (2017). Type I/type III collagen ratio associated with diverticulitis of the colon in young patients. *Journal of Surgical Research*, 207: 229-234.
- Chandika, P., Ko, S.C., Oh, G.W., Heo, S.Y., Nguyen, V.T., Jeon, Y.J., Lee, B., Jang, C.H., Kim, G.H., Park, W.S.; Chang, W., Choi, I.W. & Jung, W.K. (2015). Fish collagen/alginate/chitoooligosaccharides integrated scaffold for skin tissue regeneration application. *International Journal of Biological Macromolecules*, 81: 504-513.
- Chang, S.W. & Buehler, M.J. (2014). Molecular biomechanics of collagen molecules. *Materials Today*, 17(2): 70-76.
- Cai, L., Wu, X., Lv, W., Xu, Y., Mi, G. & Li, J. (2015). The neuroprotective and antioxidant activities of protein hydrolysates from grass carp (*Ctenopharyngodon idella*) skin. *Journal of Food Science and Technology*, 52(6): 3750-3755.
- Chen, J., Li, L., Yi, R., Xu, N., Gao, R. & Hong, B. (2016a). Extraction and characterization of acid-soluble collagen from scales and skin of tilapia (*Oreochromis niloticus*). *LWT - Food Science and Technology*, 66: 453-459.
- Chen, S., Chen, H., Xie, Q., Hong, B., Chen, J., Hua, F., Bai, K., He, J., Yi, R. & Wu, H. (2016b). Rapid isolation of high purity pepsin-soluble type I collagen from scales of red drum fish (*Sciaenops ocellatus*). *Food Hydrocolloids*, 52: 468-477
- Cho, J.K., Jin, Y.G., Rha, S.J., Kim, S.J. & Hwang, J.H. (2014). Biochemical characteristics of four marine fish skins in Korea. *Food Chemistry*, 159: 200-207.
- Choonpicharn, S., Jaturasitha, S., Rakariyatham, N., Suree, N. & Niamsup, H. (2015). Antioxidant and antihypertensive activity of gelatin hydrolysate from Nile tilapia skin. *Journal of Food Science and Technology*, 52(5): 3134-3139.
- Chung, H. J. & Uitto, J. (2010). Type VII Collagen: The Anchoring Fibril Protein at Fault in Dystrophic Epidermolysis Bullosa. *Dermatologic Clinics*, 28(1): 93-105.
- Daboor, S.M., Budge, S.M., Ghaly, A.E., Brooks, M.S. & Dave, D. (2010). Extraction and Purification of Collagenase Enzymes: A Critical Review. *American Journal of Biochemistry and Biotechnology*, 6: 239-263.
- Darmanto, Y.S., Agustini, T.W., Swastawati, F. & Al Bulushi, I. (2014). The effect of fish bone collagens in improving food quality. *International Food Research Journal*, 21(3): 891-896.
- Di, Y., Chang-Feng, C., Bin, Guo-Fang, W. & Zhong-Rui, L. (2014). Characterization of acid- and pepsin-soluble collagens from spines and skulls of skipjack tuna (*Katsuwonus pelamis*). *Chinese Journal of Natural Medicines*, 12: 712-720.
- Duarte, A.S., Correia, A., Esteves, A.C. (2014). Bacterial collagenases – A review. *Critical Reviews in Microbiology*, 1-21.

- Elango, J., Bu, Y., Bin, B., Geevaretnam, J., Robinson, J.S. & Wu, W. (2017). Effect of chemical and biological cross-linkers on mechanical and functional properties of shark catfish skin collagen films. *Food Bioscience*, 17: 42-51.
- Ennaas, N., Hammami, R., Gomaa, A., Bedard, F., Biron, E., Subirade, M., Beaulieu, L. & Fliss, I. (2016). Collagencin, an antibacterial peptide from fish collagen: Activity, structure and interaction dynamics with membrane. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 473: 642-647.
- FAO. (2016). The state of world fisheries and aquaculture. *The State of World Fisheries and Aquaculture 2016*, 160p.
- Fauzi, M.B., Lokanathan, Y., Aminuddin, B.S., Ruszymah, B.H.I. & Chowdhury, R.S. (2016). Ovine tendon collagen: Extraction, characterisation and fabrication of thinfilms for tissue engineering applications. *Materials Science and Engineering C*, 68:163–171.
- Ferraro, V., Anton, M. & Santé-Lhoutellier, V. (2016). The “sisters”  $\alpha$ -helices of collagen, elastin and keratin recovered from animal by-products: Functionality, bioactivity and trends of Application. *Trends in Food Science & Technology*, 51: 65-75.
- Ferreira, A.M., Gentile, P., Chiono, V. & Ciardelli, G. (2012). Collagen for bone tissue regeneration. *Acta Biomaterialia*, 8: 3191-3200.
- Flavahan, P.W., McDaid, K., Watters, T., Finch, M. & Mantry, S. (2016). Collagen cross-linking treatment increases adhesion in mock corneal grafts. *Contact Lens and Anterior Eye*, 39: 416-419.
- Gebauer, J.M., Kobbe, B., Paulsson, M., Wagener, R. (2015). Structure, evolution and expression of collagen XXVIII: Lessons from the zebrafish. *Matrix Biology*, 49: 106–119.
- Gelse, K., Pöschl, E. & Aigner, T. (2003). Collagens—structure, function, and biosynthesis. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 55:1531-1546.
- Giraud-Guille, M.M., Besseau, L.; Chopin, C.; Durand, P. & Herbage, D. (2000). Structural aspects of fish skin collagen which forms ordered arrays via liquid crystalline states. *Biomaterials*, 21(9): 899-906.
- Gómez-Guillén, M.C., Giménez, B., López-Caballero, M.E. & Monter, M.P. (2011). Functional and bioactive properties of collagen and gelatin from alternative sources: A review. *Food Hydrocolloids*, 25: 1813-1827.
- Hashim, P., Mohd Ridzwan, M.S., Bakar, J. & Mat Hashim, D. (2015). Collagen in food and beverage industries. *International Food Research Journal*, 22(1): 1-8.
- Huang, C.Y., Kuo, J.M., Wu, S.J. & Tsai, H.T. (2016). Isolation and characterization of fish scale collagen from tilapia (*Oreochromis*) by a novel extrusion–hydro-extraction process. *Food Chemistry*, 190: 997-1006.
- Hsu, H.S., Uemura, T., Yamaguchi, I., Ikoma, T. & Tanaka, J. (2016). Chondrogenic differentiation of human mesenchymal stem cells on fish scale collagen. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 122(2): 219-225.
- Hwang, J.H., Mizuta, S., Yokoyama, Y & Yoshinaka, R. (2007). Purification and characterization of molecular species of collagen in the skin of skate (*Raja kenosjei*). *Food Chemistry*, 100: 921-925.
- Iwai, K., Hasegawa, T., Taguchi, Y., Morimatsu, F., Sato, K., Nakamura, Y., Higashi, A., Kido, Y., Nakabo, Y. & Ohtsuki, K. (2005). Identification of food-derived collagen peptides in human blood after oral ingestion of gelatin hydrolysates. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53(16): 6531-6.
- Jamilah, B., Umi Hartina, M.R., Mat Hashim, D. & Sazili, A.Q. (2013). Properties of collagen from barramundi (*Lates calcarifer*) skin. *International Food Research Journal*, 20(2): 835-842.
- Jankangram, W., Chooluck, S. & Pomthong, B. (2016). Comparison of the properties of collagen extracted from dried jellyfish and dried squid. *African Journal of Biotechnology*, 15(16): 642-648.
- Jeevithan, E., Bao, B., Zhang, J., S. Hong & Wu, W. (2015). Purification, characterization and antioxidant properties of low molecular weight collagenous polypeptide (37 kDa) prepared from whale shark cartilage (*Rhincodon typus*). *Journal of Food Science and Technology*, 52(10): 6312-6322.
- Junqueira, L.C. & Carneiro, J. (2013). Histologia básica. Rio de Janeiro, Brasil.
- Kim, S.K. & Venkatesan, J. (2014). Introduction to seafood processing by-products. In: S.K. Kim (Ed). *Seafood Processing By-Products Trends and Applications* (pp. 2–4). Springer New York Heidelberg Dordrecht London.
- Kaewdang, O., Benjakul, S., Kaewmanee, T. & Kishimura, H. (2014). Characteristics of collagens from the swim bladders of yellowfin tuna (*Thunnus albacares*). *Food Chemistry*, 155: 264-270.

- Krishnamoorthi, J., Ramasamy, P., Shanmugam, V. & Shanmugam, A. (2017). Isolation and partial characterization of collagen from outer skin of *Sepia pharaonis* (Ehrenberg, 1831) from Puducherry coast. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 10: 39-45.
- Kittiphattanabawon, P., Benjakul, S., Visessanguan, W., Kishimura, H. & Shahidi, F. (2010a). Isolation and Characterisation of collagen from the skin of brownbanded bamboo shark (*Chiloscyllium punctatum*). *Food Chemistry*, 119: 1519-1526.
- Kittiphattanabawon, P., Benjakul, S., Visessanguan, W., Kishimura, H. & Shahidi, F. (2010b). Isolation and characterization of collagen from the cartilages of brownbanded bamboo shark (*Chiloscyllium punctatum*) and blacktip shark (*Carcharhinus limbatus*). *Food Science and Technology*, 43: 792-800.
- Kozłowska, J., Sionkowska, A., Skopinska-Wisniewska, J. & Piechowicz, K. (2015). Northern pike (*Esox lucius*) collagen: Extraction, characterization and potential application. *International Journal of Biological Macromolecules*, 81: 220-227.
- Kuttappan, S., Mathew, D. & Nair, M.B. (2016). Biomimetic composite scaffolds containing bioceramics and collagen/gelatin for bone tissue engineering - A mini review. *International Journal of Biological Macromolecules*, 93: 1390-1401.
- Lima, C.A., Freitas-Junior, A.C.V., Lima-Filho, J.L., Converti, A., Marques, D.A.V., Carneiro da-Cunha, M.G., Porto, A.L.F. (2013). Two-phase partitioning and partial characterization of a collagenase from *Penicillium aurantiogriseum* URM 4622: Application to collagen hydrolysis. *Biochemical Engineering Journal*, 75: 64-71.
- Lin, Y.K & Liu, D.C. (2006). Comparison of physical-chemical properties of type I collagen from different species. *Food Chemistry*, 99: 244-251.
- Lynn, A.K., Yannas, I.V. & Bonfield, W. (2004). Antigenicity and immunogenicity of collagen. *J. Biomed. Mater. Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials*, 71B(2): 343-354.
- Liu, D., Liang, L., Regenstein, J.M. & Zhou, P. (2012). Extraction and characterisation of pepsin-solubilised collagen from fins, scales, skins, bones and swim bladders of bighead carp (*Hypophthalmichthys nobilis*). *Food Chemistry*, 133: 1441-1448.
- Makareeva, E. & Leikin, S. (2014). Collagen Structure, Folding and Function. In Shapiro, J.R., Byers, P.H., Glorieux, F.H., Sponseller, P.D. (Eds). *Osteogenesis Imperfecta: A Translational Approach to Brittle Bone Disease* (pp. 71-83). New York: Elsevier.
- Masilamani, D., Madhan, B., Shanmugam, G., Palanivel, S. & Narayan, B. (2016). Extraction of collagen from raw trimming wastes of tannery: a waste to wealth approach. *Journal of Cleaner Production*, 113: 338-344.
- Muralidharan, N., Shakila, R.J., Sukumar, D. & Jeyasekaran, G. (2013). Skin, bone and muscle collagen extraction from the trash fish, leather jacket (*Odonus niger*) and their characterization. *Journal of Food Science and Technology*, 50(6):1106-1113.
- Muyonga, J.H.; Cole, C.G.B. & Duodu, K.G. (2004). Characterisation of acid soluble collagen from skins of young and adult Nile perch (*Latesniloticus*). *Food Chemistry*, 85: 81-89.
- Myllyharju, J. & Kivirikko, K.I. (2004). Collagens, modifying enzymes and their mutations in humans, flies and worms. *Trends in Genetics*, 20: 33-43.
- Nalinanon, S., Benjakul, S., Kishimura, H. & Osako, K. (2011). Type I collagen from the skin of ornate threadfin bream (*Nemipterus hexodon*): Characteristics and effect of pepsin hydrolysis. *Food Chemistry*, 125: 500-507.
- Olsen, B.R. (1995). New insights into the function of collagens from genetic analysis. *Current Opinion in Cell Biology*, 7:720-727.
- Oliveira, V.M., Assis, C.R.D., Herculano, P.N., Cavalcanti, M.T.H., Bezerra, R.S. & Porto, A.L.F. (2017a). Collagenase from smooth weakfish: extraction, partial purification, characterization and collagen. *Boletim do Instituto de Pesca*, 43(1): 52-64.
- Oliveira, V.M., Carneiro Cunha, M.N., Assis, C.R.D., Nascimento, T.P., Herculano, P.N., Cavalcanti, M.T.H. & Porto, A.L. (2017b). Colagenases de pescado e suas aplicações industriais. *Pubvet*, 11(3): 243-255.
- Pati, F., Dhara, S. & Adhikari, B. (2010). Fish Collagen: A Potential Material for Biomedical Application. *Proceedings of the 2010 IEEE Students' Technology Symposium*, 3:34-38.
- Pal, G., K. & Suresh, P.V. (2017). Comparative assessment of physico-chemical characteristics and fibril formation capacity of thermostable carp scales collagen. *Materials Science and Engineering: C*, 70: 32-40.

- Pires, A.L.R., Bierhalz, A.C.K. & Moraes, A.M. (2015). Biomateriais: tipos, aplicações e mercado. *Química Nova*, 38(7): 957-971.
- Prestes, R.C. (2013). Collagen and Its Derivatives: Characteristics and Applications in Meat Products. *UNOPAR Científica Ciências Biológicas e da Saúde*, 15(1): 65-74.
- Senaratne, L.S., Park, P.J. & Kim, S.K. (2006). Isolation and characterization of collagen from brownbacked toadfish (*Lagocephalusgloveri*) skin. *Bioresource Technology*, 97:191-197.
- Siddiqui, Y.D., Arief, E.M., Yusoff, A., Hamid, S.S.A., Norani, T.Y. & Abdullah, M.Y.S. (2013). Extraction, Purification and Physical Characterization of Collagen from Body wall of Sea cucumber *Bohadschia bivittata*. *Health and the Environment Journal*, 4(2): 53-65.
- Singh, P., Benjakul, S., Maqsood, S., & Kishimura, H. (2011). Isolation and characterization of collagen extracted from the skin of striped catfish (*Pangasianodon hypophthalmus*). *Food Chemistry*, 124:97-105.
- Sinthusamran, S., Benjakul, S. & Kishimura, H. (2013). Comparative study on molecular characteristics of acid soluble collagens from skin and swim bladder of seabass (*Lates calcarifer*). *Food Chemistry*, 138: 2435-2441.
- Sionkowska, A., Kozłowska, J., Skorupska, M. & Michalska, M. (2015). Isolation and characterization of collagen from the skin of *Brama australis*. *International Journal of Biological Macromolecules*, 80: 605-609.
- Söderhäll, C., Marenholz, I., Kerschler, T., Ruschendorf, F., Esparza-Gordillo, J., Worm, M., Gruber, C., Mayr, G., Albrecht, M., Rohde, K., Schulz, H., Wahn, U., Hubner, N. & Lee, Y. (2007). Variants in a novel epidermal collagen gene (COL29A1) are associated with atopic dermatitis. *PLOS Biology*, 5:1952-1961.
- Song, E., Yeon, K., S., Chun, T., Byun, H.J. & Lee, Y.M. (2006). Collagen scaffolds derived from a marine source and their biocompatibility. *Biomaterials*, 27: 2951-2961.
- Tang, L., Chen, S., Su, W., Weng, W., Osako, K. & Tanaka, M. (2015). Physicochemical properties and film-forming ability of fish skin collagen extracted from different freshwater species. *Process Biochemistry*, 50(1): 148-155.
- Teruel, S.R.L.T. (1997). Purification and characterization of collagenases from the skeletal muscle of winter flounder (*Pseudopleuronectes americanus*). [Tese]. McGill University Montreal, Quebec.
- Tonhi, E. & Plepis, A.M.G. (2002). Obtenção e caracterização de blendas colágeno-quitosana. *Química Nova*, 25:943-948.
- Tamilmozhi, S., Veeruraj, A. & Arumugam, M. (2013). Isolation and characterization of acid and pepsin-solubilized collagen from the skin of sailfish (*Istiophorus platypterus*). *Food Research International*, 54: 1499-1505.
- Thuy, L.T.M., Okazaki, E. & Osako, K. (2014). Isolation and characterization of acid-soluble collagen from the scales of marine fishes from Japan and Vietnam. *Food Chemistry*, 149: 264-270.
- Uesugi, Y., Arima, J., Usuki, H., Iwabuchi, M. & Hatanaka, T. (2008). Two bacterial collagenolytic serine proteases have different topological specificities. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1784: 716-726.
- Uitto, J., Chu, M.L., Gallo, R. & Eisen, A.Z. (2008). Collagen, elastic fibers, and extracellular matrix of the dermis, In: Wolff K, Goldsmith LA, Katz SI, Gilchrist BA, Paller AS, Leffell DJ (Ed). *Fitzpatrick's dermatology in general medicine*. 7th ed. New York: McGraw-Hill.
- Veeruraj, A., Arumugam, M. & Balasubramanian, T. (2013). Isolation and characterization thermostable collagen from eel-fish (*Evenchelysmacrura*). *Process Biochemistry*, 48: 1592-1602.
- Veeruraj, A., Arumugam, M., Ajithkumar, T. & Balasubramanian, T. (2015). Isolation and characterization of collagen from the outer skin of squid (*Doryteuthissinghalensis*). *Food Hydrocolloids*, 43: 708-716.
- Voicu, G., Geanaliu-Nicolae, R.E., Pîrvan, A.A., Andronescu, E. & Iordache, F. (2016). Synthesis, characterization and bioevaluation of drug-collagen hybrid materials for biomedical applications. *International Journal of Pharmaceutics*, 510: 474-484.
- Yamamoto, K., Yoshizawa, Y., Yanagiguchi, K., Ikeda, T., Yamada, S. & Hayashi, Y. (2015). The Characterization of Fish (Tilapia) Collagen Sponge as a Biomaterial. *International Journal of Polymer Science*, 1-5.
- Zeng, S., Yin, J., Yang, S., Zhang, C., Yang, P. & Wu, W. (2012). Structure and characteristics of acid and pepsin-solubilized collagens from the skin of cobia (*Rachycentron canadum*). *Food Chemistry*, 135: 1975-1984.

- Zhang, Q., Wang, Q., Lv, S., Lu, J., Jiang, S., Regenstein, J.M. & Lin, L. (2016). Comparison of collagen and gelatin extracted from the skins of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) and channel catfish (*Ictalurus punctatus*). *Food Bioscience*, 13: 41-48.
- Zeugolis, D.I. & Raghunath, M. (2011). Collagen: Materials Analysis and Implant Uses. In: P. Ducheyne, K. Healy, D. Hutmacher, D. Grainger, C. Kirkpatrick (Eds.). *Comprehensive Biomaterials* (pp. 261-278). Ed. Elsevier.
- Wang, L., An, X., Xin, Z., Zhao, L. & Hu, Q. (2007). Isolation and characterization of collagen from the skin of deep-sea redfish (*Sebastes mentella*). *Journal of Food Scienc*, 72: E450–E455.
- Watanabe, K. (2004). Collagenolytic proteases from bacteria. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 63:520-526.
- Wisniewski, M., Sionkowska, A., Kaczmarek, H., Lazare, S., Tokarev, V. & Belin, C. (2007). Spectroscopic study of a KrFexcimer laser treated surface of the thin collagen films. *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry*, 188: 192-199.