

UNIVERSIDADE TECNOLÓGICA FEDERAL DO PARANÁ
MESTRADO PROFISSIONAL EM TECNOLOGIA DE ALIMENTOS

ALEXANDRE CALISTRO DA SILVA

**OBTENÇÃO DE COLÁGENO HIDROLISADO A PARTIR DA
HIDRÓLISE ENZIMÁTICA DA RASPA DO COURO BOVINO**

DISSERTAÇÃO

LONDRINA
2016

ALEXANDRE CALISTRO DA SILVA

**OBTENÇÃO DE COLÁGENO HIDROLISADO A PARTIR DA
HIDRÓLISE ENZIMÁTICA DA RASPA DO COURO BOVINO**

Dissertação apresentada ao Curso de
Mestrado Profissional em Tecnologia de
Alimentos, da Universidade Tecnológica
Federal do Paraná – UTFPR, Campus
Londrina.

Orientador: Prof. Dr. Fabio Augusto Garcia
Coró
Co-orientadora: Prof^a. Dra. Fernanda
Gonzales Paião

LONDRINA
2016

TERMO DE LICENCIAMENTO

Esta Dissertação está licenciada sob uma Licença Creative Commons *atribuição uso não-comercial/compartilhamento sob a mesma licença 4.0 Brasil*. Para ver uma cópia desta licença, visite o endereço <http://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/> ou envie uma carta para Creative Commons, 171 Second Street, Suite 300, San Francisco, Califórnia 94105, USA.



Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Biblioteca UTFPR - Câmpus Londrina

S586o Silva, Alexandre Calistro da
Obtenção de colágeno hidrolisado a partir da hidrólise enzimática da raspa do couro bovino / Alexandre Calistro da Silva. - Londrina : [s.n.], 2016.
45 f. : il. ; 30 cm.

Orientador: Prof. Dr. Fábio Augusto Garcia Coró
Coorientadora: Profª Drª Fernanda Gonzales Paião
Dissertação (Mestrado) - Universidade Tecnológica Federal do Paraná.
Programa de Pós-Graduação em Tecnologia de Alimentos. Londrina, 2016.
Bibliografia: f. 41-45.

1. Suplementos dietéticos. 2. Colágeno. 2. Eletroforese. I. Coró, Fábio Augusto Garcia, orient. II. Paião, Fernanda Gonzales, coorient. III. Universidade Tecnológica Federal do Paraná. IV. Programa de Pós-Graduação em Tecnologia de Alimentos. V. Título.

CDD: 664

FOLHA DE APROVAÇÃO

Título da Dissertação Nº 44

**OBTENÇÃO DE COLÁGENO HIDROLISADO A
PARTIR DA HIDRÓLISE ENZIMÁTICA DA RASPA DO
COURO BOVINO**

por

ALEXANDRE CALISTRO DA SILVA

Esta dissertação foi apresentada como requisito parcial à obtenção do grau de **MESTRE EM TECNOLOGIA DE ALIMENTOS – Área de Concentração: Tecnologia de Alimentos**, pelo Programa de Pós-Graduação em Tecnologia de Alimentos – PPGTAL – da Universidade Tecnológica Federal do Paraná – UTFPR – Câmpus Londrina às 15h de 02 de setembro de 2016. O trabalho foi aprovado pela Banca Examinadora, composta por:

Dr. Fabio Augusto Garcia Coró
UTFPR Câmpus Londrina
Orientador

Dra. Adriana Aparecida Droval
UTFPR Câmpus Campo Mourão
Membro Examinador Titular

Dra. Lucia Felicidade Dias
UTFPR Câmpus Londrina
Membro

Visto da coordenação:

Prof. Fábio A. Coró, Dr.
(Coordenador do PPGTAL)

"A Folha de Aprovação assinada encontra-se na Coordenação do Programa de Mestrado Profissional em Tecnologia de Alimentos"

AGRADECIMENTOS

Ao Professor Dr. Fabio Augusto Garcia Coró, pela orientação, compreensão, e ensinamentos que ajudaram no desenvolvimento desta dissertação.

A Professora Dra. Fernanda Gonzales Paião, pela orientação, auxílio e conselhos dos quais foram essenciais para execução deste trabalho.

A Professora Dra. Mayka Reghiany Pedrão, ao apoio, conselhos e ensinamentos que ajudaram na execução desta dissertação e serão sempre lembrados.

A Ms. Gleice Rocha dos Santos, pelo apoio, amizade, colaboração e paciência.

A A.M.Goldstein do Brasil Alimentos Ltda., especialmente ao Sr. Higino Francisco, por acreditar nas minhas ideias, pelo apoio moral e financeiro, e inclusive pela amizade.

Aos docentes do curso de Pós Graduação em Tecnologia de Alimentos da UTFPR, pelos ensinamentos.

A minha noiva Francielle Almeida do Nascimento, por me aturar, e apoiar minhas ideias.

A Thamires Silva Souza, pela ajuda na elaboração dos testes e tratamentos.

A Deus, por me dar saúde e sabedoria, e ter colocado no meu caminho pessoas que me apoiaram, aturaram, ensinaram, orientaram e de certa forma fizeram com que esse trabalho fosse concluído.

RESUMO

SILVA, Alexandre C. **OBTENÇÃO DE COLÁGENO HIDROLISADO A PARTIR DA HIDRÓLISE ENZIMÁTICA DA RASPA DO COURO BOVINO**. 45f. Dissertação (Mestrado Profissional em Tecnologia de Alimentos) - Universidade Tecnológica Federal do Paraná. Londrina, 2016.

O colágeno hidrolisado é usado como suplemento alimentar, com intuito de suprir a perda de colágeno que ocorre com a idade. Com cadeia polipeptídica longa e peso molecular de aproximadamente 300 kDa, o colágeno em sua forma nativa possui baixa absorção pelo organismo humano. Para se obter um produto de fácil absorção é necessário hidrolisar o colágeno pela ação de enzimas, onde a matéria prima utilizada tem sido o colágeno obtido de fontes diversas, como couro do peixe, pele de frango, entre outras. Este trabalho teve como objetivo tratar colágeno de raspas de couro bovino com diferentes enzimas para se obter colágeno com frações peptídicas que o tornem facilmente absorvíveis pelo organismo. O colágeno isolado foi submetido à digestão por 6 diferentes enzimas (pepsina, colagenase, neutrase, tripsina, papaína e alcalase) nas concentrações de 0,5 e 1 g/100g de enzima sobre substrato (E/S) por 1, 2 e 4 horas de tratamento. Após o tratamento os produtos oriundos das digestões foram submetidos à eletroforese *Sodium Dodecyl Sulphate – Polyacrilamide Gel Eletrophoresis* para avaliação da massa molecular obtidas. Independentemente do tempo e concentração de enzima utilizadas, os tratamentos com pepsina e colagenase apresentaram frações peptídicas acima de 40 kDa. Já os tratamentos com neutrase e tripsina apresentaram amplo intervalo de fracionamento, sendo que os produtos obtidos variaram de 10 a 120 kDa. As menores frações peptídicas foram obtidas com as enzimas papaína e alcalase. A papaína não produziu bandas definidas e seu fracionamento se mostrou dependente do tempo e concentração de enzima, onde produziu todas as frações abaixo de 25 kDa somente após 4 horas de tratamento contendo 1 g/100g E/S. No entanto o tratamento contendo 0,5 g/100g de alcalase por 4 horas, e os tratamentos contendo 1 g/100g desta enzima foram capazes de fracionar todo o colágeno em bandas abaixo de 25 kDa. A papaína apesar de ter frações abaixo de 25 kDa se mostrou menos eficiente quando comparado com a alcalase, que atingiu o objetivo em um menor tempo e concentração. Desta forma as enzimas papaína e alcalase mostraram potencial na produção de colágeno hidrolisado. Estudos mais aprofundados devem ser realizados com ambas as enzimas, para caracterizar o hidrolisado produzido e determinar suas aplicações comerciais.

Palavras-chave: Suplemento alimentar; Massa molecular; Eletroforese.

ABSTRACT

SILVA, Alexandre C. **HYDROLYZED COLLAGEN OBTAINING BY ENZYMATIC HYDROLYSIS OF BOVINE HIDE SPLITS**. 45p. Dissertation (Professional Master in Food Tecnology) – Federal Technological University of Paraná. Londrina, 2016.

Hydrolyzed collagen is used as food supplement, with intention to supply the collagen loss that occurs by aging. With long polypeptide chain and molecular weight of about 300 kDa, the native form of collagen presents low absorption by the human body. To obtain an easy absorbable product, hydrolysis of collagen by enzymes action is necessary, whereas collagen from variables fonts has been used as raw material as fish leather, chicken leather, and others. The aim of this work was to treat collagen from bovine hide splits by deferent enzymes to obtain collagen peptides fractions easy absorbable by the human body. The isolated collagen was digested by 6 deferent enzymes (pepsin, collagenase, neutrase, trypsin, papain and alcalase) in concentrations of 0,5 e 1 g/100g E/S by 1, 2 and 4 hours treatment. After treatments, the products from digestions were submitted to electrophoresis (SDS-PAGE) for evaluation of molecular weight obtained. Independent of time and concentration of enzymes used, the treatment with pepsin and collagenase showed peptidic fraction over 40 kDa. Treatments with neutrase and trypsin showed wide interval of peptidic fraction, being that the products obtained ranged from 10 to 120 kDa. The best peptidic fractions were obtained by treatments with the enzymes papain and alcalase. The papain did not produced defined band and the fractioning showed dependent of time and concentration of enzyme, whereas produced only fractions lower than 25 kDa after 4 hours treatment with 1 g/100g E/S. however the treatment containing 0,5 g/100g of alcalase by 4 hours, and the ones with 1 g/100g of this enzyme were capable to fractionate all the collagen content in band lower than 25 kDa. The papain although has produced fraction lower than 25 kDa, showed lower efficiency when compared to alcalase, that reached the goal in a shorter time and concentration. In this way papain and alcalase showed potential on hydrolyzed collagen production. Further studies involving booth enzymes should be made, to characterize the hydrolysate produced and the commercial application.

Key-Words: Food supplement, Molecular Weight, Electrophoresis.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Corte da pele bovina, mostrando posição da flor e da raspa	13
Figura 2 – Estrutura do colágeno: (a) forma de triplete presente nas matrizes colagênicas; (b) tropocolágeno; (c) hélice tripla	16
Figura 3- Esquema da Síntese das Fibras de Colágeno. (1) Síntese das cadeias alfa; (2) Formação do procolágeno; (3) Clivagem das extremidades N e C terminais; (4) Empacotamento das moléculas de colágeno	18
Figura 4 – Esquema do Tratamento Térmico e Enzimático do Colágeno	22
Figura 5 – Eletroforese vertical.....	24
Figura 6 – Raspa de couro bovino (A), Raspa após lavagem e trituração (B) e Fibra de colágeno concentrada (C)	26
Figura 7 – Gel de eletroforese, (A) tratamento com colagenase. (B) tratamento com pepsina. (1) Mr, (2, 3 e 4) 0,5 g/100g E/S por 1, 2 e 4h respectivamente, (5,6 e 7) 1 g/100g E/S por 1, 2 e 4h respectivamente.....	34
Figura 8 – Gel de eletroforese, (A) tratamento com neutrase. (B) tratamento com tripsina. (1) Mr, (2, 3 e 4) 0,5 g/100g E/S por 1, 2 e 4h respectivamente, (5,6 e 7) 1 g/100g E/S por 1, 2 e 4h respectivamente	35
Figura 9 – Gel de eletroforese, (A) tratamento alcalase. (B) tratamento com papaina. (1) Mr, (2, 3 e 4) 0,5 g/100g E/S por 1, 2 e 4h respectivamente, (5,6 e 7) 1 g/100g E/S por 1, 2 e 4h respectivamente.....	37

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Condições de Tratamento Enzimático do Colágeno.....	28
Tabela 2 – Esquema do Preparo das Amostras para Eletroforese.....	29
Tabela 3 – Caracterização da Amostra	32

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

HCl	Ácido Clorídrico
HClO ₄	Ácido Perclórico
cm	Centímetros
E/S	Enzima/Substrato
FDA	Do Inglês <i>Food and Drug Administration</i>
g	Gramas
NaOH	Hidróxido de Sódio
h	Horas
kDa	Do Inglês <i>Kilodalton</i>
Mr	Marcador de Massa Molecular
µg	Micrograma
µL	Microlitros
mA	Miliampère
mL	Mililitro
min.	Minutos
nm	Nanômetros
N	Normal
H ₂ O ₂	Peróxido de Hidrogênio
p/p	Peso/Peso
g/100g	Porcentagem (%)
pH	Potencial Hidrogeniônico
P-DMAB	P-dimetilaminobenzaldeido
rpm	Rotações por minuto
SDS-PAGE	Do Inglês <i>Sodium Dodecyl Sulphate – Polyacrilamide Gel Electrophoresis</i>
UV	Ultravioleta
v/v	Volume/Volume

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	11
2. OBJETIVOS	12
2.1. OBJETIVO GERAL	12
2.2. OBJETIVOS ESPECIFICOS	12
3. REFERENCIAL TEÓRICO	13
3.1. RASPA DO COURO BOVINO	13
3.2. EFEITO DA INGESTÃO DOS PEPTÍDEOS DE COLÁGENO	14
3.3. COLÁGENO	15
3.3.1. Biossíntese do Colágeno	17
3.3.2. Hidroxiprolina	18
3.4. PRODUTOS DERIVADOS DO COLÁGENO	19
3.4.1. Colágeno hidrolisado	19
3.4.2. Colágeno Hidrolisado x Gelatina (Colágeno parcialmente hidrolisado)	20
3.5. HIDRÓLISE DO COLÁGENO	21
3.5.1 Hidrólise Enzimática	22
3.6. ELETROFORESE	23
4. MATERIAL E MÉTODOS	25
4.1. MATÉRIA PRIMA	25
4.1.1. Extração do Colágeno da Raspa de Couro Bovino	25
4.2. DETERMINAÇÃO DA COMPOSIÇÃO QUÍMICA	26
4.2.1. Determinação do Conteúdo de Colágeno	27
4.3. HIDRÓLISE DO COLÁGENO	27
4.4. LIOFILIZAÇÃO	28
4.5. AVALIAÇÃO DA MASSA MOLECULAR (SDS-PAGE)	29
4.5.1. Preparo das Amostras	29
4.5.2. Condições da Eletroforese em Gel SDS-PAGE	30
4.5.3. Coloração do Gel de Eletroforese	31
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	32
5.1. ANÁLISE DA MATÉRIA PRIMA	32
5.2. AVÁLIAÇÃO DA MASSA MOLECULAR	33
5.2.1. Alta Massa Molecular	33
5.2.2. Média Massa Molecular	35
5.2.3. Baixa Massa Molecular	36
6. CONCLUSÃO	40
REFERÊNCIAS	41

1. INTRODUÇÃO

O apelo constante mantido pela classe médica e mídia com a preocupação estética e a prevenção de doenças precoces degenerativas, como artrite, artrose, entre outras, tem levado os consumidores a buscar melhoria nos hábitos alimentares, visando saúde e bem-estar. Com isso houve um incremento nas pesquisas por alimentos e ingredientes que possuam propriedades terapêuticas, além das funções nutricionais habituais (MOSKOWITZ, 2000; FARIA et al. 2008; ZIEGLER e SGARBIERI, 2009; DIAMANTINO, 2011). Um exemplo é o colágeno hidrolisado, que vem sendo usado como suplemento alimentar, com intuito de suprir a perda de colágeno que ocorre com a idade.

A suplementação com peptídeos de colágeno pela medicina Chinesa relata o aumento da elasticidade da pele, melhora na densidade óssea e alívio nos sintomas da artrite e osteoporose (ZHANG et al., 2014). O colágeno hidrolisado tem sido utilizado para fins terapêuticos, melhorando a circulação sanguínea, diminuindo problema nas articulações e atuando na redução de úlceras gastrointestinais (KIM, MENDIS, RAJAPAKISE, 2005; RODRIGUES, 2009).

O colágeno é obtido a partir de fontes diversas, como couro do peixe, pele de frango, de boi entre outras (SCHAUSS, 2012; SHIGEMURA et al. 2014). Sendo o Brasil o segundo maior produtor e terceiro maior exportador de couro bovino do mundo (CICB e APEX-BRASIL, 2016), a raspa do couro destes animais apresenta uma matéria prima abundante, já que é um coproduto da indústria curtumeira.

O colágeno em sua forma nativa possui baixa absorção pelo organismo humano, por ser uma proteína de cadeia polipeptídica longa e alto peso molecular. Para se obter um produto de fácil absorção é necessário hidrolisar, que pode ser realizado empregando-se diferentes enzimas e tratamentos físicos (ZHANG et al. 2014).

2. OBJETIVOS

2.1. OBJETIVO GERAL

Avaliar a hidrólise de colágeno obtido da raspa de couro bovino por diferentes enzimas, e obter frações peptídicas inferiores a 25 kDa.

2.2. OBJETIVOS ESPECIFICOS

- Aplicar e definir enzimas que resultam no melhor perfil peptídico para obter-se frações de baixo peso molecular;
- Analisar através de eletroforese quais as enzimas que hidrolisaram o colágeno para obtenção dos menores fragmentos peptídicos;
- Definir a melhor enzima a ser utilizada e suas características de hidrólise, assim como pH, temperatura, tempo e concentração.

3. REFERENCIAL TEÓRICO

3.1. RASPA DO COURO BOVINO

A raspa do couro bovino “é o subproduto decorrente da divisão da pele animal correspondente ao lado carnal, curtido e beneficiado” (BRASIL, 2005). Após abate e esfolação (retirada da pele) do animal, as peles são enviadas para os curtumes. Estes são indústrias especializadas na transformação da pele do animal em “couro”, todavia, para que isso ocorra, processos de limpeza (limpeza), curtimento (estabilização) e acabamento são necessários. Dependendo do tempo entre o abate e o início do tratamento, as peles podem ser conservadas com adição de sal, e recebem o nome de pele salgada, ou podem ser imediatamente processadas sem receberem tratamento, sendo assim chamadas de pele fresca ou verde (PACHECO, 2005).

No curtume as peles recebidas, permanecem em conservação até o uso, sendo posteriormente classificadas de acordo com o seu peso e cor. A primeira etapa de processamento é a limpeza, e tem como objetivo principal realizar a limpeza, eliminar partes e sujidades que não farão parte do produto final (couro). A etapa de divisão está incluída entre os vários processos da limpeza e consiste em dividir a pele em duas camadas, sendo uma camada superior externa, de interesse para o curtume, que recebe o nome de “flor”, e uma camada interna e inferior, considerada coproduto, chamada de “raspa” (Figura 1) (PACHECO, 2005).

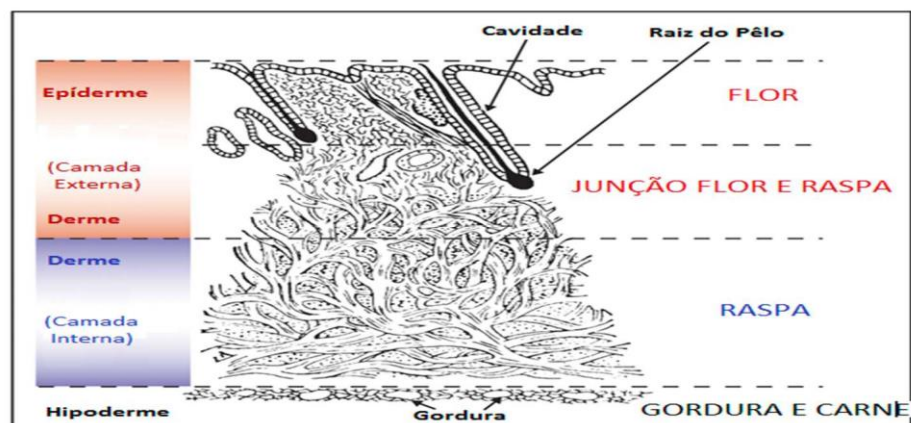


Figura 1 - Corte da pele bovina, mostrando posição da flor e da raspa.

Fonte: Adaptado de NOKE, K.; SHIPMAN, J. (2015).

No processo de produção de couro são gerados resíduos sólidos e líquidos, sendo que os principais resíduos sólidos são raspas e aparas (resíduos menores da raspa ou da pele, proveniente do corte manual com faca). A raspa é constituída basicamente de colágeno e na etapa de divisão corresponde à camada abaixo da flor e carrega porções de carne e gordura (SUNDAR et al., 2010).

Dependendo da demanda e da qualidade da raspa dividida, estas podem seguir o processamento idêntico ao couro até a etapa de curtimento, quando de boa qualidade, ou serem separadas na divisão e enviadas para as indústrias de alimentos e/ou indústrias de ração animal (*pet food*) (CELESTINO, 2010).

3.2. EFEITO DA INGESTÃO DOS PEPTÍDEOS DE COLÁGENO

Vários trabalhos vêm sendo realizados em relação da ingestão dos peptídeos de colágeno, em sua maioria o objetivo é avaliar o efeito de dosagens específicas sobre doenças crônicas e degenerativas, como por exemplo artrite e osteoporose.

No ano de 2000, o pesquisador Dr. Moskowitz em sua revisão sobre os efeitos da ingestão de colágeno hidrolisado de grau farmacêutico no tratamento de artrite e osteoporose, observou que a dose de ingestão diária indicada era de 10 g, e que em pacientes que receberam essa dose de colágeno hidrolisado comparado com a ingestão de placebo, tiveram redução nas dores causadas por artrite, aumento do teor de hidroxiprolina no sangue, mínimos efeitos adversos, aumento considerável de colágeno hidrolisado na cartilagem. Então conclui-se que o colágeno hidrolisado de grau farmacêutico é de potencial utilidade para o tratamento de artrite e osteoporose, e que seu alto grau de segurança o torna bastante atrativo.

O efeito do colágeno hidrolisado no metabolismo ósseo, especialmente no tratamento da osteoporose foi estudado por Guillerminet et al. (2009) onde concluíram que a dieta com colágeno hidrolisado aumenta a atividade dos osteoblastos, que agem na remodelagem e aumento do diâmetro externo do fêmur.

Em estudo recente, Schauss (2012), observou que houve uma redução significativa nas dores causadas pela artrite, e também um aumento significativo nas atividades físicas do grupo suplementado com colágeno hidrolisado. Estudo similar foi

realizado por Bruyre (2012), que também encontrou efeitos positivos no uso colágeno hidrolisado.

Por sua vez Zhang et al. (2013), estudaram o efeito do colágeno hidrolisado sobre a inibição da enzima conversora da angiotensina (ECA). A angiotensina é um hormônio que ajuda na regulação da pressão arterial, onde vários problemas relacionados à hipertensão estão ligados a essa enzima. Concluíram que colágeno hidrolisado tem potentes peptídeos capazes de inibir a ECA, porém seu efeito é dependente do pré-tratamento e da hidrólise realizada. Pesquisa similar havia sido realizada por Jang e Lee (2004), na qual o hidrolisado chegou a inibir 52,8 % da atividade da ECA.

Zhang et al. (2014), usaram colágeno hidrolisado de tendão de veado, e avaliaram o efeito na perda óssea em ratas ovarietomizadas, e concluíram que as suplementações com os peptídeos de colágeno podem prevenir e tratar a perda óssea.

Shigemura et al. (2014), hidrolisou colágeno até massa molecular entre 1 e 5 kDa, e avaliaram a presença de hidroxiprolina em sangue humano após ingestão. A absorção máxima foi atingida em 2 h após ingestão, e os autores afirmam que doses abaixo de 30,8 mg/Kg podem não ser efetivas em trazer benefícios.

3.3. COLÁGENO

Em 1893 o Dicionário Oxford definiu colágeno como aquele constituído de tecido conectivo que produz gelatina quando aquecido, definição que serviu de base de referência para estudos de 1940. A definição proposta por Oxford vem do Frances *collagène* que conseqüentemente se origina do Grego, *kolla* (cola), *gene* (produção, formação), portanto colágeno é aquele que produz cola (RAMACHANDRAN, 1967).

O colágeno é a mais abundante proteína nos vertebrados e constitui cerca de 30 % das proteínas totais do corpo humano. O colágeno tipo I também chamado de tropocolágeno está presente em tendões, ligamentos, ossos, entre outros, sendo o mais abundante correspondendo em até 90 % do total de proteínas da derme (PRESTES et al., 2013).

O colágeno nativo ou tipo I possui três cadeias polipeptídicas sendo duas $\alpha 1(I)$ e uma $\alpha 2(I)$. Cada cadeia $\alpha 1$ possui 1056 resíduos de aminoácidos e a cadeia $\alpha 2$ possui 1038 resíduos, dando origem a uma tripla hélice de 300 nm de comprimento e 1,5 nm de diâmetro. Além da região helicoidal, o colágeno possui extremidades não helicoidais, denominadas de telopeptídeos N e C terminal com 16 e 26 resíduos de aminoácidos, respectivamente (GOISSIS, 2007)

A taxa de síntese e degradação do colágeno determina o tamanho de suas fibrilas, conseqüentemente sua força e resistência. Cada cadeia polipeptídica é caracterizada através do triplete Gly-x-y, sendo Gly (glicina), X geralmente uma prolina e Y geralmente uma hidroxiprolina, estes aminoácidos são encontrados em uma proporção de 33 g/100g, 12 g/100g e 11 g/100g respectivamente (Figura 2) (RODRIGUES, 2009).

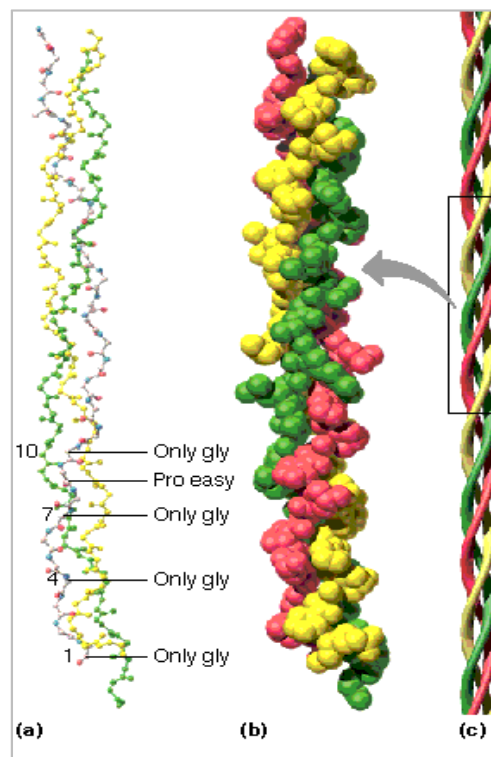


Figura 2 – Estrutura do colágeno: (a) forma de triplete presente nas matrizes colagênicas; (b) tropocolágeno; (c) hélice tripla.

Fonte: Smith (1968).

3.3.1. Biossíntese do Colágeno

Na biossíntese do colágeno os genes $\alpha 1$ e $\alpha 2$ são ativados nos fibroblastos, onde o RNA mensageiro de cada cadeia α se desloca para o citoplasma e os traduz em cadeias polipeptídicas. As cadeias α sintetizadas no retículo endoplasmático rugoso são denominados pró-peptídeos, as quais apresentam extremidades amino e carboxiterminal. No retículo endoplasmático, resíduos de prolina e lisina sofrem ações enzimáticas, sendo hidroxiladas e dando origem a hidroxiprolina e hidroxilisina. Em seguida resíduos de hidroxilisina sofrem adição de açúcares e são glicosiladas, sendo a reação catalisada por enzimas glucosil e galactosil transferases. A partir da porção carboxiterminal os pró-peptídeos iniciam a formação da tripla hélice por ligações dissulfeto, dando origem ao pró-colágeno (SHOULDERS; RAINES, 2009).

Após serem secretados para matriz extracelular, as enzimas N e C-proteinases entram em ação e clivam as regiões telopeptídicas, dando origem ao tropocolágeno. Por não apresentarem a sequência Gly-x-y, as regiões telopeptídicas não possuem formato helicoidal (SHOULDERS; RAINES, 2009). Por um processo denominado fibrogenese as moléculas de tropocolágeno se alinham, e com empacotamento lateral e longitudinal dão início as ligações cruzadas intermoleculares, que ocorrem principalmente nos grupos aldeídos da lisina e hidroxilisina das regiões telopeptídicas, dando origem as fibrilas de colágeno (GOISSIS, 2007).

De quatro a oito moléculas de colágeno em seções cruzadas constituem uma unidade básica para formação das fibras de colágeno (Figura 3). A estrutura interna é estabilizada por ligações cruzadas do tipo covalente. O colágeno é constituído por mais de 20 aminoácidos, sendo 9 considerados essenciais para o corpo humano (SCHRIEBER; GAREIS, 2007).

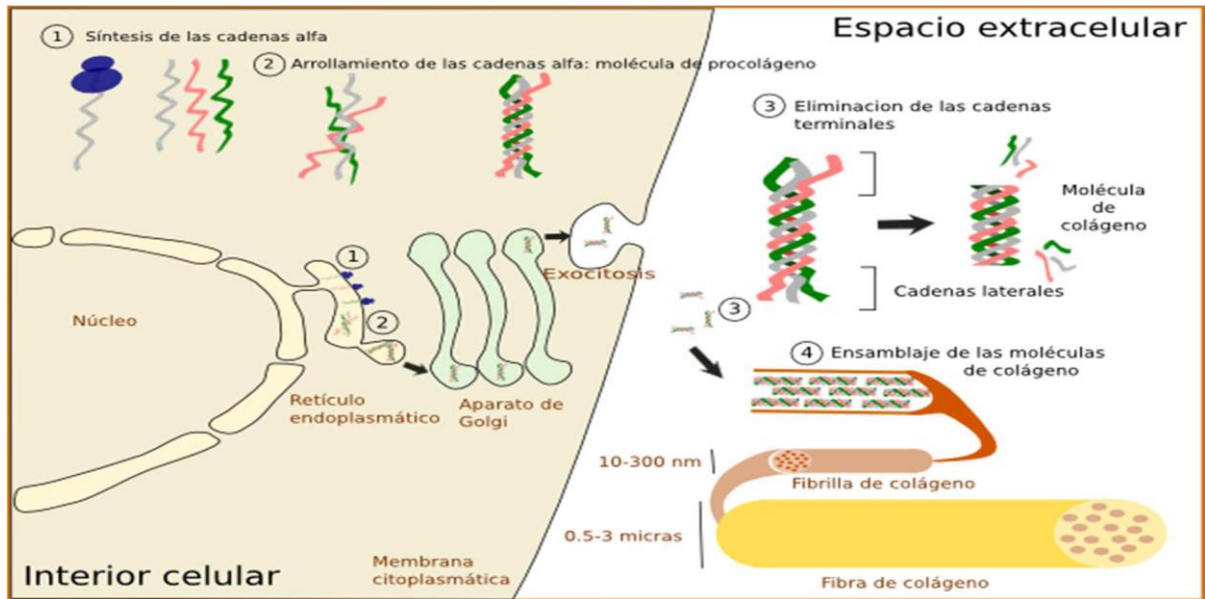


Figura 3- Esquema da Síntese das Fibras de Colágeno. (1) Síntese das cadeias alfa; (2) Formação do procolágeno; (3) Clivagem das extremidades N e C terminais; (4) Empacotamento das moléculas de colágeno.

Fonte: Atlas de Histologia Vegetal e Animal (2015).

3.3.2. Hidroxiprolina

A hidroxiprolina é um aminoácido encontrado exclusivamente na proteína de colágeno, junto com a prolina este aminoácido garante a estabilidade da tripla hélice, com aquecimento prolongado a perda deste aminoácido não permite a formação da tripla hélice, portanto o teor de hidroxiprolina é usado como parâmetro para estabelecer a quantidade de colágeno em um material qualquer (PRESTES, 2012).

O método mais utilizado para quantificação da hidroxiprolina é o colorimétrico, que consiste na oxidação da hidroxiprolina livre em ácido pirrocarbônico pela ação da cloramina T. O ácido pirrocarbônico formado reage com P-DMAB, cuja absorvância é medida a 558 nm em espectrofotômetro e a concentração pode ser medida através da correlação com o padrão de hidroxiprolina (ANGELINI, 2011).

Sabendo que uma molécula de colágeno contém aproximadamente 12,5 g/100g do aminoácido hidroxiprolina, seu teor é então multiplicado por 8, expressando assim o teor de proteína de colágeno presente na amostra (PRESTES et al., 2013).

3.4. PRODUTOS DERIVADOS DO COLÁGENO

O tipo de tecido, idade do animal e tipo de colágeno são fatores intrínsecos que afetam a qualidade de derivados de colágeno. Há mais de 27 tipos de colágeno, sendo o tipo I o mais abundante, adquirido principalmente de subprodutos do abate de bovino, suínos, aves e peixe, como pele, ossos, cartilagem, entre outros (GÓMEZ-GUILLÉN et al., 2011).

A partir do colágeno tipo I são obtidos alguns produtos como, gelatina (colágeno parcialmente hidrolisado), colágeno hidrolisado, fibra natural de colágeno e colágeno em pó, sendo que cada um apresenta características e aplicações distintas. As principais diferenças entre esses quatro derivados são a capacidade de retenção de água, o poder de geleificação e a concentração de colágeno, sendo que essas diferenças estão relacionadas ao processo de extração e tratamento. Quanto maior a temperatura e mais drástico o processo de extração, menor o teor de colágeno obtido (PRESTES et al, 2013).

3.4.1. Colágeno hidrolisado

O colágeno hidrolisado, também pode ser chamado de gelatina hidrolisada e peptídeos de colágeno. Independente da nomenclatura, o colágeno hidrolisado não possui "Bloom" (medida de força de gel), pois não forma gel, sendo proveniente de várias hidrólises enzimáticas e possui massa molecular entre 0,5 e 25 kDa (PRESTES, 2012; SCHIEBER e GAREIS, 2007).

Colágeno hidrolisado é um composto polipeptídico obtido através de várias hidrólises de degradação do colágeno (ZHANG; LI; SHI, 2005). Trata-se de uma proteína natural derivada do colágeno nativo, extraída de pele e ossos de bovinos, suínos, aves e peixes. Sua diferença em relação ao colágeno nativo além da sua massa molecular, é que o colágeno hidrolisado é solúvel em água ou salmoura e apresenta teor proteico entre 84 e 90 g/100g (PRESTES, 2012).

Peptídeos de colágeno são geralmente consumidos como produtos alimentícios para suprir a perda de colágeno pela idade (KOUJUCHI et al., 2012).

Esses peptídeos vêm mostrando grandes resultados em tratamentos de pele, osteoporose e artrite, das quais sofrem ataque pela idade, exposição aos raios UV, entre outros. Podem ser encontrados em forma de suplemento alimentar, em formulações de alimentos, produtos farmacêuticos e cosméticos (ZHAGUE et al., 2011).

3.4.2. Colágeno Hidrolisado x Gelatina (Colágeno parcialmente hidrolisado)

Gelatina é um polipeptídeo de alta massa molecular derivada do colágeno, seu tratamento industrial implica em hidrólise parcial da estrutura nativa do colágeno transformando-o em uma forma solúvel em água quente (ZAGUE et al., 2011). A hidrólise da gelatina ocorre em temperaturas acima de 65 °C podendo ser ácida produzindo gelatina tipo A com massa molecular entre 30 e 300 kDa ou alcalina produzindo gelatina tipo B com massa molecular de 100 kDa (PRESTES, 2012).

Comercialmente a qualidade das gelatinas é medida através do seu “*Bloom*” e estabilidade térmica, das quais são extremamente dependentes do tipo de matéria prima de colágeno e do seu pré-tratamento (GÓMEZ-GUILLÉN et al., 2011).

O colágeno hidrolisado é um polipeptídeo de baixa massa molecular. Utilizando a mesma matéria prima da gelatina, sua temperatura de hidrólise varia entre 37 e 60 °C, sendo necessário o uso de enzimas para obtenção de polipeptídios com massa molecular entre 0,5 e 25 kDa. Derivados de colágeno com massa molecular menor que 20 kDa não são capazes de formar gel. Sua principal característica é a solubilidade em água fria, e por não formar gel é caracterizado como “Zero Bloom” (PRESTES, 2012; SCHRIEBER e GAREIS, 2007).

O colágeno hidrolisado, é geralmente comercializado com massa molecular abaixo de 10 kDa. Alguns trabalhos consideram que a melhor faixa para colágeno hidrolisado se situa entre 3 e 6 kDa e colágeno super-hidrolisado abaixo de 3 kDa (ZAGUE et al., 2011).

Produtos como gelatina e colágeno hidrolisado são reconhecidos pela FDA como produtos seguros, podendo ser usados como alimentos ou aditivos alimentares. Apesar de ser considerada uma proteína de baixo valor biológico, pois não contém todos os aminoácidos essenciais, esse é um respeitável componente nutricional. O

colágeno é muitas vezes utilizado para complementar outras proteínas devido a sua alta digestibilidade e alta tolerância dos consumidores (ZAGUE, 2008).

O colágeno hidrolisado é geralmente comercializado em pó, na qual a secagem da solução hidrolisada é feita em *spray dryer*. Produtos derivados de colágeno com concentrações maiores que 5 g/100g, só podem ser secos em *spray dryer* com ajuda de carreadores como gomas, amido e açúcares. Em concentrações acima de 5 g/100g as moléculas de colágeno se juntam formando fibras novamente, o que impede a secagem instantânea, formando uma crosta de colágeno na parede do equipamento. Por sua vez o colágeno hidrolisado não possui capacidade de formação de gel e/ou fibras novamente, podendo ser seco em equipamento de *spray dryer* sem ajuda de carreadores, mesmo em altas concentrações (SCHRIEBER; GAREIS, 2007).

3.5. HIDRÓLISE DO COLÁGENO

A hidrólise do colágeno pode ocorrer de várias formas, sendo térmica, química ou enzimática, ou então uma combinação, dependendo do produto final pretendido.

A tripla hélice do colágeno é estabilizada por pontes de hidrogênio, os aminoácidos hidroxiprolina e prolina estão diretamente relacionados a esta estabilidade térmica da tripla-hélice, quando em aquecimento permanente o colágeno sofre quebra de ligações de hidrogênio e conseqüentemente perda da estrutura fibrilar (ANGELINI, 2011). A degradação térmica do colágeno nativo ocorre a temperaturas superiores a 40 °C (ZHANG; LI; SHI, 2005).

Tratamentos químicos, como o emprego de ácido acético, provocam intumescimento do tecido e dissolução das fibras de colágeno promovendo melhores condições para ação da hidrólise por enzimas. Este tratamento não degrada a estrutura nativa do colágeno, portanto a degradação das ligações cruzadas covalentes das regiões telopeptídicas deve ser realizada com o uso de enzimas, das quais a pepsina é a mais utilizada (SIMÕES, 2013).

3.5.1 Hidrólise Enzimática

A atividade catalítica de enzimas vem sendo utilizada pelo homem por milhares de anos. As enzimas são proteínas potentes e eficazes que catalisam uma reação química diminuindo sua energia de ativação. Essas possuem atividades biológicas específicas, portanto são capazes de reagir com determinados substratos. A velocidade da reação catalítica das enzimas varia de acordo com concentração E/S, temperatura e pH (KIELING, 2002).

A hidrólise enzimática vem ganhando papel importante nas indústrias de extração de colágeno. Onde vários estudos apresentam eficiência do uso de enzima em colágenos e gelatinas para produção de peptídeos bioativos (GÓMEZ-GUILLÉN et al., 2011).

Com aquecimento o colágeno perde a conformação de tripla hélice e se transforma em gelatina e o resultado da posterior degradação enzimática elimina a habilidade de formação de gel, aumentando sua solubilidade e o transformando em peptídeos de colágeno (Figura 4) (KOUGUCHI et al., 2012).

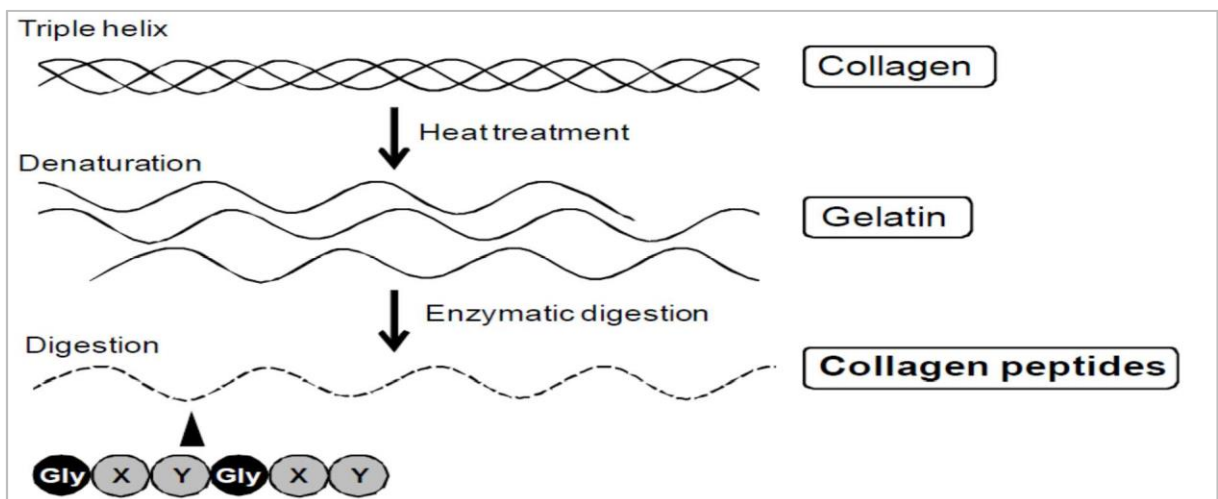


Figura 4 – Esquema do Tratamento Térmico e Enzimático do Colágeno.

Fonte: KOUGUCHI et al. (2012)

Enzimas de alta especificidade são geralmente usadas para hidrólise de colágeno, porém as frações de peptídeos produzidas não são tão pequenas. Nessa perspectiva, dentro de uma das possibilidades básicas para degradação de colágeno,

tem-se as enzimas tripsina, quimotripsina e pepsina, que clivam somente ligações peptídicas envolvendo o grupo carboxílico de aminoácidos básicos (RAMACHANDRAN, 1967). Este mesmo autor destaca que existem as collagenases de origem bacteriana, que por sua vez são capazes de hidrolisar as porções apolares da cadeia de colágeno, e dessa forma se tornam uma ferramenta complementar. A aplicação da combinação dos dois grupos de enzimas permite uma hidrólise seletiva devido a suas especificidades aplicadas em diferentes pontos da cadeia de colágeno.

Em seu estudo Zhang et al. (2013), usaram as seguintes enzimas: alcalase, collagenase, proteinase K, pepsina, tripsina e termolisina, onde estudaram o efeito de diferentes pré-tratamentos em colágeno tipo I de pele bovina, bem como o grau de hidrólise de cada enzima separadamente e seus efeito sobre a enzima conversora da angiotensina (hormônio que atuação na regulação da pressão arterial). Segundo estes autores, a alcalase é uma enzima da família das serino proteases, que possui ampla especificidade, sendo capaz de hidrolisar o colágeno em um curto período de tempo.

Segundo Zhou et al. (2012), a pepsina é capaz de clivar ligações peptídicas na região telopeptídica sem prejudicar a integridade da tripla hélice, por esse motivo é a mais usada na hidrólise para extração do colágeno.

Na hidrólise enzimática do colágeno da pele de tilápia, em trabalho desenvolvido por Whang et al. (2013), utilizaram papaína e alcalase, onde definiram temperaturas de 50 °C e 54 °C, e pH 6 e 8, respectivamente, como ideais para hidrólise do colágeno. Neste mesmo trabalho definiram que essas enzimas isoladas possuem efeito reduzido na hidrólise do colágeno, e quando usadas em conjunto reduzem drasticamente o tempo de hidrólise, sendo capazes de produzirem hidrolisados de massa molecular bastante baixa.

3.6. ELETROFORESE

Segundo Wilson & Walker (2010), o termo eletroforese pode ser descrito como a migração de uma partícula carregada sob a influência de um campo elétrico. Em determinado valor de pH, as biomoléculas podem adquirir carga negativa ou positiva, e quando submetidas a um campo elétrico irão migrar de acordo com sua carga.

O método mais usado para eletroforese de proteína é o SDS-PAGE. Neste método as moléculas são separadas por tamanho, permitindo a determinação da massa molecular relativa da proteína (figura 5).

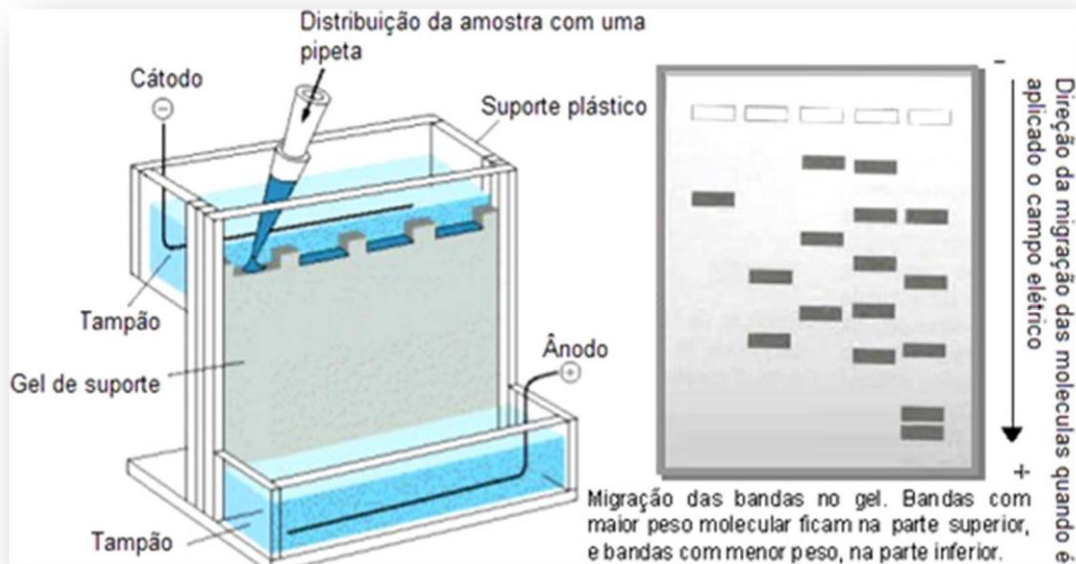


Figura 5 - Eletroforese Vertical

Fonte: PEDROSO, 2009.

A fonte é ligada após aplicação de todas as amostras, assim as proteínas carregadas negativamente se movem com a mesma mobilidade em direção ao ânodo, e desta forma são separadas por tamanho. A propriedade de peneiramento do gel permite que moléculas de tamanho menor passem mais facilmente através dos poros do gel, alcançando uma distância maior, enquanto moléculas maiores encontram resistência, e assim percorrem distâncias menores.

A massa molecular relativa pode ser determinada através da comparação entre a mobilidade da proteína em estudo e o padrão conhecido como “Mr”, que possui proteínas com massa molecular conhecida.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. MATÉRIA PRIMA

A matéria prima utilizada foi o colágeno bovino do tipo I, em forma de fibra de colágeno concentrada. O colágeno foi extraído da raspa fresca do couro bovino e cedido pela empresa A.M.Goldstein do Brasil Alimentos Ltda. Situada em Londrina – Paraná.

4.1.1. Extração do Colágeno da Raspa de Couro Bovino

Raspas frescas adquiridas de curtumes da região foram previamente descarnadas e selecionadas, após remoção de sujidade (como excesso de carne, gordura, resíduos químicos e microbiológicos) foram submetidas a vários passos de lavagem por aproximadamente 30 h. Para isso os seguintes passos foram realizados: reidratação e pré-lavagem com NaOH, desengraxe com detergente aniônico, enxague para remoção do excesso de detergente, alvejamento com H₂O₂, descalcinação com HCl e ajuste do pH para facilitar a moagem e extração.

Após lavagem as raspas foram moídas em moinho de carne, hidratadas e homogeneizadas em moinho coloidal, acidificada com ácido acético pH 3,0 e deixada em repouso a temperatura de 10 °C por 6 h. A seguir, a pasta de colágeno foi então precipitada com adição de 2,5 mol de cloreto de sódio. O precipitado obtido foi submetido a sucessivos enxagues com água para remoção do excesso de cloreto de sódio, e as fibras adquiridas foram drenadas e centrifugadas para remoção do excesso de água e aumento da concentração (Figura 6). Para melhor conservação as fibras foram embaladas a vácuo em sacos de polietileno e mantidas resfriada até o dia do uso.

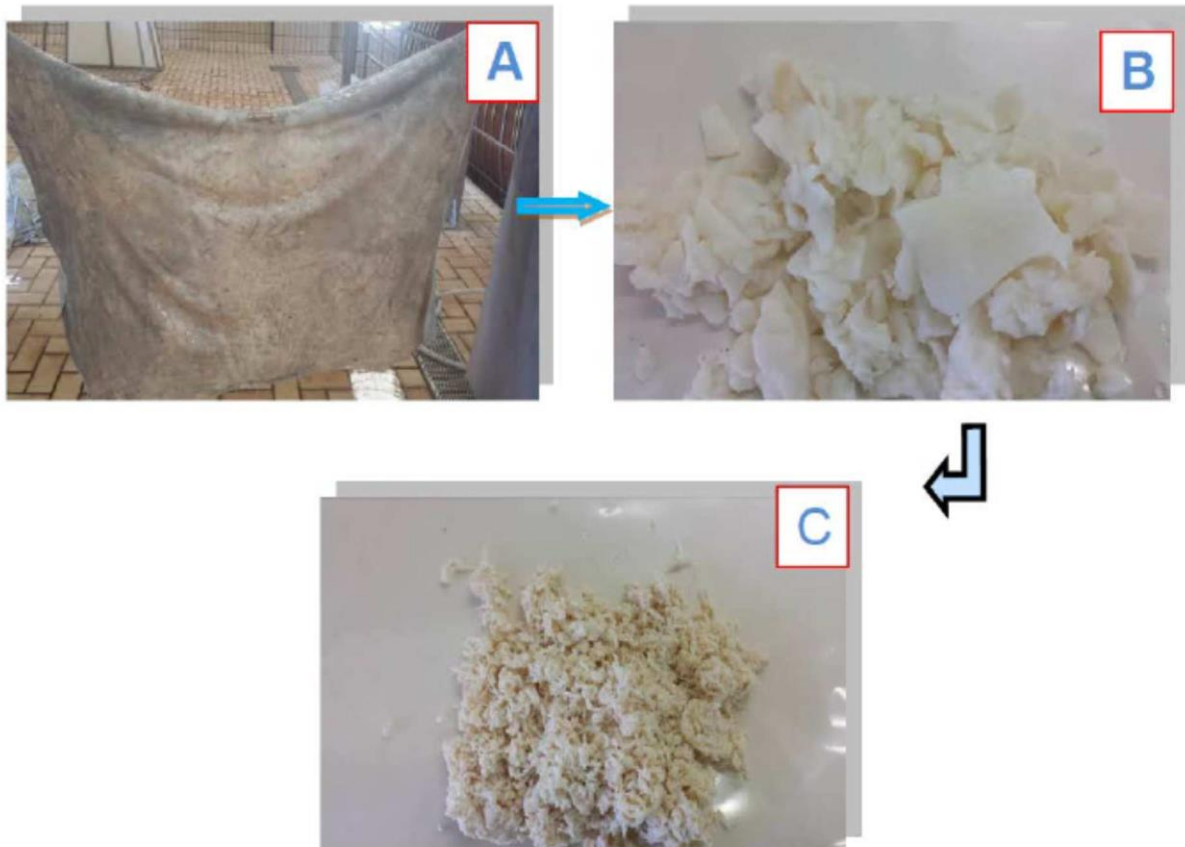


Figura 6 – Raspa de couro bovino (A), Raspa após lavagem e trituração (B) e Fibra de colágeno concentrada (C).

Fonte: Própria.

Todos os processos envolvendo a extração e lavagem, descritos nos parágrafos anteriores, foram realizados e repassados pela empresa A.M.Goldstein do Brasil Alimentos Ltda. Mais detalhes sobre esse processo não foram apresentados por se tratar de segredo industrial.

4.2. DETERMINAÇÃO DA COMPOSIÇÃO QUÍMICA

As análises da composição química da fibra de colágeno foram: pH, umidade em estufa a 105 °C, teor de proteína bruta e cinzas totais, realizadas em triplicata, seguindo-se metodologia descrita pelo Instituto Adolfo Lutz (2008). Para o teor de proteína bruta o fator de conversão utilizado foi 5,55, devido ao alto teor de colágeno da amostra.

4.2.1. Determinação do Conteúdo de Colágeno

O conteúdo de colágeno foi determinado pelo teor do aminoácido hidroxiprolina conforme metodologia descrita por Woessner (1961), Edwards e O'Brien (1979), com adaptações e multiplicado por 8,0 conforme recomendado por Kolar (1990). A metodologia consistiu na adição de aproximadamente 125 mg de amostra em 15 mL de HCl 6 N e 1 mL de HCl concentrado e essa solução permaneceu por 6 h sob temperatura de 105 °C. A solução foi filtrada em papel filtro, as ampôlas foram lavadas e o líquido recolhido em erlenmeyer de 250 mL. O pH foi ajustado entre 6 e 7 com NaOH 50 g/100g e HCl 6 N. A solução foi transferida para um balão de 250 mL e o volume completado com água ultrapura. Em uma proveta de 25 mL foram adicionados 1 mL de amostra, 1 mL de água ultrapura e 1 mL de solução oxidante de hidroxiprolina (cloramina T). Após 5 min a temperatura ambiente foram adicionados, 1 mL de HClO₄ 3,15 mol/L e 1 mL do reagente de cor (P-DMAB), a solução foi então aquecida a 60 °C por 20 min. Após resfriada foi realizada leitura em 557 nm com auxílio de um espectrofotômetro. Os valores obtidos nas leituras foram submetidos ao cálculo da equação da reta obtido com padrão de hidroxiprolina. Esta concentração foi expressa em µg/mL. O teor de hidroxiprolina foi multiplicado por 8,0, e a concentração de colágeno expressa em g/100 g.

4.3. HIDRÓLISE DO COLÁGENO

Para hidrólise do colágeno foram utilizadas 6 diferentes enzimas, todas provenientes da empresa Sigma Aldrich. Cada enzima foi submetida a condições ideais de temperatura e pH. As mesmas foram adicionadas em concentrações de 0,5 e 1 g/100g p/p sobre substrato (colágeno tipo I) e incubadas por três diferentes tempos, sendo 1, 2 e 4h (Tabela 1). Os valores de temperatura e pH ideais, assim como as concentrações e os tempos citados acima, foram baseados em informações de diferentes literaturas.

Tabela 1 – Condições de Tratamento Enzimático do Colágeno

Enzima	Atividade Enzimática	pH	Temperatura [°C]	E/S* [g/100g]	Tempo [h]
Alcalase 2.4I (P4860)	2.4 U/g	8.0	54	0,5 e 1	1, 2 e 4
Neutrase 0.8 (P1236)	0.8 U/g	6,5	50	0,5 e 1	1, 2 e 4
Papaina (P4762)	≥ 10 U/mg	5,5	50	0,5 e 1	1, 2 e 4
Tripsina (P4799)	1K – 2K U/mg	8.0	37	0,5 e 1	1, 2 e 4
Colagenase (C0130)	≥ 125 U/mg	7,5	37	0,5 e 1	1, 2 e 4
Pepsina (P7000)	≥ 250 U/mg	2,5	37	0,5 e 1	1, 2 e 4

E/S*= Concentração de enzima x substrato (considerando matéria seca de colágeno).

Fonte: Autoria Própria

Aproximadamente 1,25 g de fibra de colágeno concentrada foram adicionadas em um erlenmeyer de 250 mL contendo 50 mL de água ultrapura. O pH foi ajustado com NaOH 0,05 mol/L ou HCl 0,1 mol/L, e a solução foi incubada estufa com circulação a ar na temperatura ideal. Após atingirem condições ideais, concentrações de 0,5 e 1 g/100g de enzima foram adicionadas aos tratamentos.

As soluções foram mantidas sob agitação a uma velocidade de 120 rpm. O pH foi constantemente monitorado e ajustes foram realizados com NaOH 0,05 mol/L e HCl 0,1 mol/L durante o tratamento.

Decorrido o período de incubação, as amostras foram imediatamente incubadas em banho aquecido a 90 °C por 15 min com objetivo de inativar as enzimas e interromper o processo de hidrólise. A seguir foram resfriadas em banho de água gelada até atingirem a temperatura ambiente. Após resfriamento as amostras foram acondicionadas em placas de Petri, cobertas com papel filme e congeladas para posterior liofilização.

4.4. LIOFILIZAÇÃO

As amostras foram liofilizadas no Laboratório de Bioquímica da Universidade Estadual de Londrina, em Liofilizador TelStar, com temperatura de -80 °C, e vácuo constante por aproximadamente 48 h até atingirem peso constante. Após a liofilização,

as amostras foram adicionadas em frascos com tampa e acondicionadas em freezer até o dia do uso.

4.5. AVALIAÇÃO DA MASSA MOLECULAR (SDS-PAGE)

Para determinação das massas moleculares do colágeno hidrolisado com diferentes enzimas, foi utilizada a eletroforese SDS-PAGE conforme descrito por Laemmli (1970). Todos os géis, tampões e reagentes foram adquiridos da empresa Sigma Aldrich.

4.5.1. Preparo das Amostras

Primeiramente foram realizados experimentos pilotos com o objetivo de estabelecer a melhor concentração dos produtos hidrolisados a serem aplicados no gel. Para isso, os produtos liofilizados foram ressuspensos em água ultrapura em diferentes concentrações de forma que possibilitasse o preparo das amostras para corrida e que fosse aplicado entre 5 e 1000 µg de proteína hidrolisada por canaleta. As amostras já diluídas foram preparadas e aplicadas em alíquotas de 10, 20 e 30 µL por canaleta e as quantidades de amostras e reagentes para os experimentos variaram conforme Tabela 2.

Tabela 2 – Esquema do Preparo das Amostras para Eletroforese

	Volume de Amostra por Injeção		
	10µL [5-25µg]*	20µL [50-200µg]*	30µL [200-1000µg]*
Amostra [µL]	5	10	20
Tampão de Amostra [µL]	2,5	5	7,5
Redutor [µL]	1	2	3
H₂O [µL]	1,5	3	0

*Concentração de proteína hidrolisada aplicada por canaleta do gel de eletroforese.

Fonte: Autoria Própria

No experimento piloto foi definida a concentração que proporcionou melhor resolução nas bandas de proteína, e essa foi utilizada nos experimentos. Portanto 20 μL de solução contendo 10 μL de amostra (solução contendo 50 μg de proteína), 5 μL de tampão de amostra (TRUPAGE LDS Sample Buffer 4x (PCG3009)), 2 μL de redutor (TRUPAGE DTT Sample Reducer 10x (PCG3005)), e 3 μL de água ultrapura foram aplicados por canaleta do gel. Após a adição dos reagentes, as amostras foram vigorosamente agitadas, incubadas a 70 °C por mais 10 min, e mantidas sobre a bancada por aproximadamente 5 min.

4.5.2. Condições da Eletroforese em Gel SDS-PAGE

Para a eletroforese foi preparada uma solução contendo 50 mL de tampão de corrida (TRUPAGE Running Buffer TEA-MOPS SDS 20x (PCG3003)), 950 mL de água ultrapura e 62 μL de antioxidante de corrida (TRUPAGE Running antipxodant. 800x), a solução foi então adicionada a cuba de corrida contendo o gel.

Géis de gradiente de poli(acrilamida) com concentração de 4-12 g/100g e 4-20 g/100g foram utilizados para separação dos produtos de hidrólise. Na primeira canaleta do gel foi aplicado 4 μL de Mr (BLUEeye Prestained Protein Ladder), contendo as seguintes massas moleculares pré-definidas em kDa: (5,6), (10,5), (14,5), (21,1), (30,1), (41,9), (54), (70,3), (92), (132), (175) e (235).

Nas canaletas após o Mr foram aplicadas as amostras em ordem crescente de tempo e concentração. Ou seja, primeiro foram aplicadas as amostras cujos tratamentos usaram 0,5 g/100g E/S nos tempos de 1, 2 e 4 h, respectivamente, e na sequência os tratamentos que usaram 1 g/100g E/S em ordem crescente de tempo.

Após aplicação das amostras o gel foi submetido a uma voltagem de 180 \leq 110 mA, por aproximadamente 50 min (segundo recomendações do fabricante). Utilizou-se uma cuba de corrida da marca Loccus, modelo Vertical verti i-10, com capacidade para dois géis simultâneos e suporte para géis 10 x 10 cm, e a fonte também da marca Loccus, modelo LPS-300V.

4.5.3. Coloração do Gel de Eletroforese

O gel foi corado e descorado conforme procedimento descrito pelo fabricante. Todos os passos foram executados a temperatura de 65 °C e com agitação a 60 rpm, sendo que os reagentes utilizados neste processo foram previamente aquecidos antes da aplicação. Após a corrida os géis foram enxaguados com água ultrapura por duas vezes por 5 min, e corado por 30 min com 100 mL de solução de coloração 0,08 g/100g Coomassie Brilhante Blue G-250 diluído em água ultrapura e ácido clorídrico (9,7:0,3 v/v). A solução de coloração foi descartada e o gel foi descorado por 16 h com solução de etanol 10 g/100g.

Após a descoloração, os géis foram fotografados por câmera digital da marca SONY, modelo DSC-HX200V e armazenados em solução de descoloração.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. ANÁLISE DA MATÉRIA PRIMA

A Tabela 3 apresenta os resultados obtidos para determinação de proteína bruta, teor de colágeno, pH e umidade. Observa-se que o produto possui elevado teor proteico, sendo este baseado na presença de colágeno, confirmando o elevado teor desta proteína na matéria prima utilizada para hidrólise posterior.

Tabela 3 – Caracterização da Matéria Prima de Raspa de Couro

Amostra	pH	Umidade [g/100g]	Proteínas totais [g/100g]	Cinzas [g/100g]	Colágeno* [g/100g]	Lipídios** [g/100g]
Fibras de colágeno	3,5	60	98,6	0,9	97,9	0,5

* Por quantificação de Hidroxiprolina

** Segundo dados de literatura

Fonte: Autoria Própria

Simões (2012) isolou colágeno da túnica albugínea de suínos imunocastrados e encontrou 92,5 g/100g desta proteína, 3,8 g/100g de cinzas, 3,6 g/100g lipídios e 11,16 g/100g de umidade. O alto valor de umidade, encontrado no presente trabalho (60 g/100g), em comparação ao de Simões (11,6 g/100g) pode estar relacionado ao processo de concentração da amostra, pois neste trabalho a umidade da fibra de colágeno foi retirada por centrifugação, e já o colágeno da túnica albugínea foi liofilizado. O alto teor de proteína encontrado na amostra está relacionado ao pré-tratamento e ao processo de extração, que reduz o teor de cinzas, lipídios e eleva o teor de proteína, devido aos processos de desengraxe e descalcinação.

5.2. AVÁLIAÇÃO DA MASSA MOLECULAR

Após hidrólise com diferentes enzimas, as amostras foram liofilizadas e submetidas à análise da massa molecular em gel de eletroforese. A eletroforese é uma análise qualitativa, e neste trabalho foi aplicada com intuito de possibilitar observação das frações e bandas produzidas com os diferentes tratamentos de hidrólise do colágeno. Os tratamentos foram separados e comparados de acordo com o perfil de fracionamento. Aqueles cujas imagens no gel demonstravam a maioria de suas bandas e frações acima de 70 kDa e formaram banda no topo do gel, foram caracterizados como os tratamentos de alta massa molecular, são eles a pepsina e a colagenase. Os tratamentos que apresentaram a maior concentração de bandas entre 10 e 70 kDa foram caracterizados como de média massa molecular, e foram provenientes da neutrase e a tripsina. Já os géis contendo um ou mais tratamentos que apresentaram apenas bandas e fracionamento abaixo de 25 kDa foram caracterizados como de baixa massa molecular, esses tratamentos foram produzidos com a alcalase e a papaína.

5.2.1. Alta Massa Molecular

Como pode ser observado na Figura 7, próximo as canaletas dos géis onde foram aplicados os tratamentos com pepsina e colagenase, nota-se bandas, indicando que a amostra possuía alta massa molecular, que não foi possível passar pelo gel de empilhamento. Sugere-se, portanto, que a fração retida no gel de empilhamento representa colágeno que não sofreu hidrólise, ou seja, ainda se encontra em sua forma nativa com aproximadamente 300 kDa.

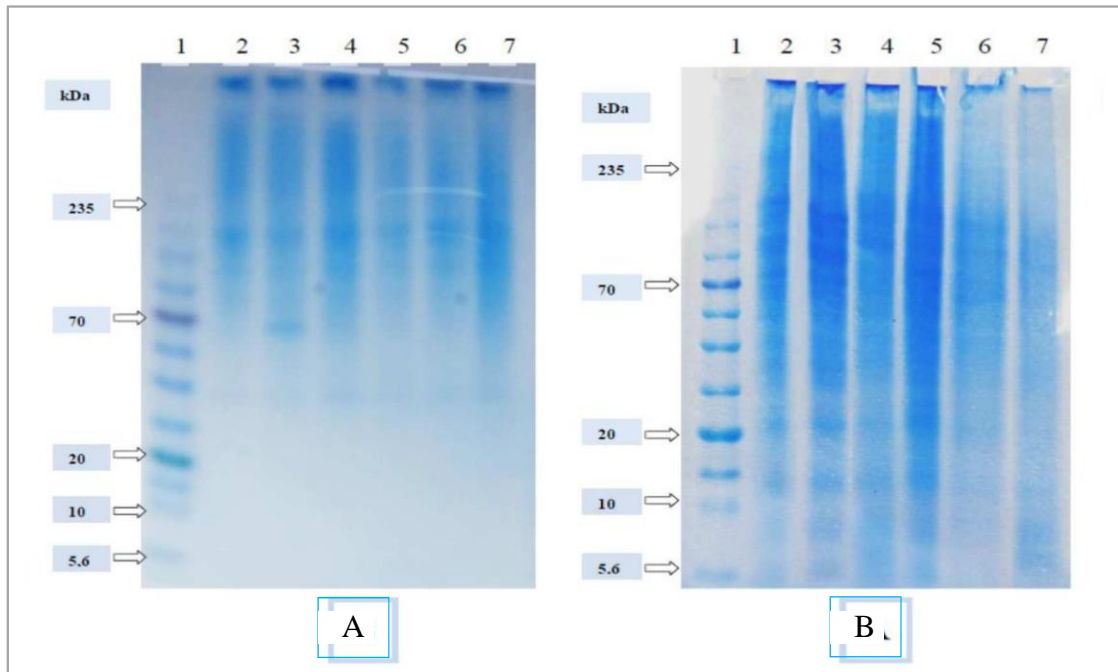


Figura 7 – Gel de eletroforese, (A) tratamento com pepsina. (B) tratamento com collagenase. (1) Mr, (2, 3 e 4) 0,5 g/100g E/S por 1, 2 e 4 h respectivamente, (5,6 e 7) 1 g/100g E/S por 1, 2 e 4 h respectivamente.

Simões (2012) hidrolisou colágeno da túnica albugínea com pepsina, porém encontrou frações maiores acima de 90 kDa, o que pode ser explicado pelas condições de tratamento, já que sua hidrólise foi realizada a 4 °C, por um período de 48h, diferentemente do realizado neste trabalho que ocorreu a 37 °C e por até 4 h, além de tratamento térmico a 90 °C por 15 min. A temperatura mais elevada utilizada nesse trabalho pode ter exposto uma maior quantidade de sítios de clivagem, permitindo maior fracionamento e menores bandas quando comparado com o trabalho de Simões (2012).

A alta massa molecular obtida na hidrólise com pepsina pode ser explicada pela sua especificidade, pois segundo Zhou et al. (2012), a pepsina é capaz de clivar apenas ligações peptídicas na região telopeptídica sem prejudicar a integridade da tripla hélice, por esse motivo é a mais usada na hidrólise para extração do colágeno.

Lima et al. (2012) hidrolisaram colágeno bovino tipo I com collagenase e observaram frações peptídicas abaixo de 11 kDa, porém não citam maiores frações peptídicas, o que pode ser claramente observado nesta dissertação. Contudo, as condições de tratamento são diferentes e podem ser a resposta para diferença nas faixas de tamanho das frações obtidas por diferentes autores.

5.2.2. Média Massa Molecular

Na Figura 8 pode ser visualizado que o gel tratado com neutrase, apresentou menor número de bandas, quando comparado com o gel tratado com tripsina. Frações abaixo de 5,6 kDa podem ser observadas no gel tratado com tripsina, porém o fracionamento ocupa uma ampla faixa de distribuição.

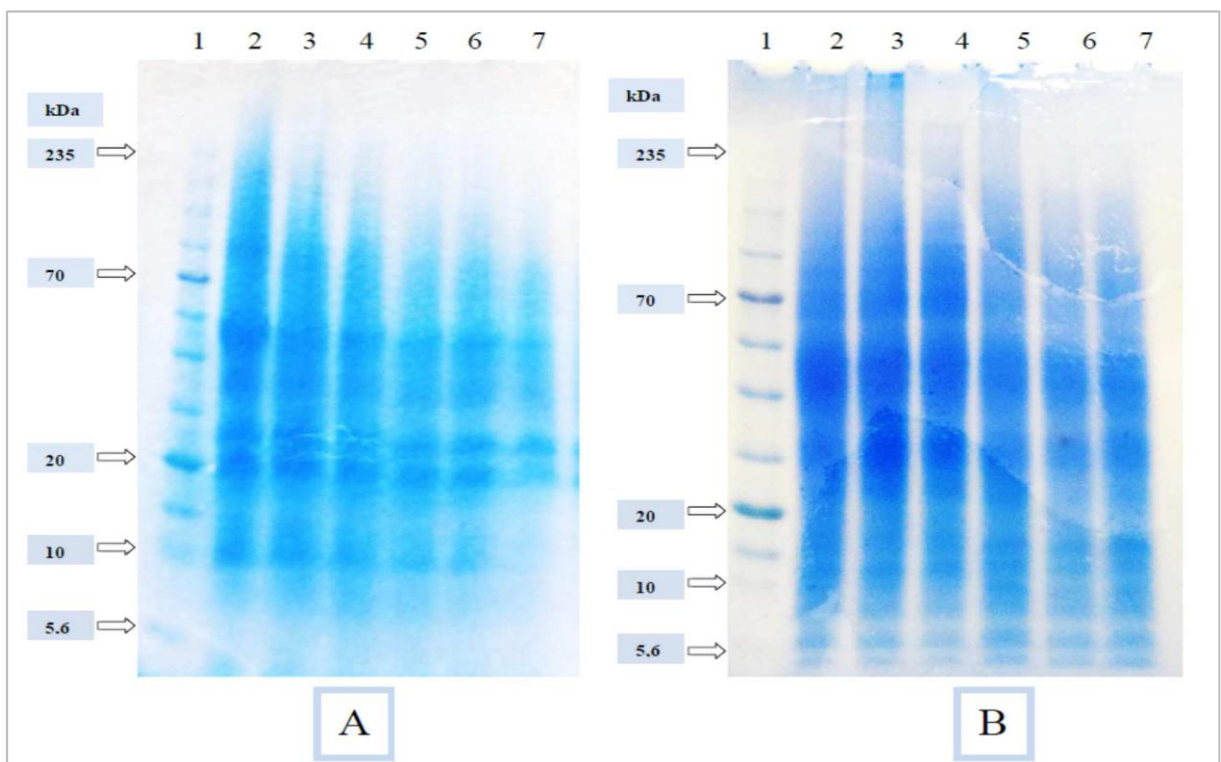


Figura 8 – Gel de eletroforese, (A) tratamento com neutrase. (B) tratamento com tripsina. (1) Mr, (2, 3 e 4) 0,5g/100g E/S por 1, 2 e 4h respectivamente, (5,6 e 7) 1g/100g E/S por 1, 2 e 4h respectivamente.

No tratamento com neutrase (Figura 8), é possível observar que com o aumento da concentração de enzima e tempo de hidrólise, ocorre um afinamento do arraste, ou seja, diminuição do arraste e menor intervalo de fracionamento.

Comparando os tratamentos com neutrase e tripsina, observa-se que a enzima neutrase produziu um menor intervalo de fracionamento permanecendo entre 10 e 50 kDa, enquanto os tratamentos com tripsina produziram um amplo intervalo de fracionamento com bandas abaixo de 5,6 e acima de 70 kDa.

Zhang et al. (2013), hidrolisaram colágeno com diferentes enzimas, entre elas a tripsina e observaram que esta enzima tem baixa eficiência na hidrólise do colágeno nativo, porém pode ser mais eficaz quando ocorre tratamento térmico anterior a hidrólise. O tratamento térmico desempacota o colágeno nativo e com isso permite a exposição de aminoácidos específicos da clivagem por tripsina, portanto para melhor eficiência da enzima um tratamento térmico prévio deveria ser aplicado (BORNSTEINS et al., 1966).

Durante o tratamento enzimático do colágeno, foi observado que as amostras tratadas com neutrase não apresentaram partículas em suspensão, ou seja, após uma hora de incubação da enzima, a solução contendo as fibras de colágeno apresentou-se límpida, sem partículas sólidas, independente da concentração de enzima. Diferentemente dos tratamentos com pepsina, tripsina, colagense e papaina cujas partículas só desapareceram após tratamento térmico de inativação.

Damrongsakkul et al. (2008), hidrolisaram raspa de couro bovino com as enzimas papaína e neutrase, observaram que após 1h de tratamento com neutrase, a amostra apresentava viscosidade baixíssima (similar a água), e ausência de partículas sólidas. Segundo os mesmos autores, a neutrase foi mais eficiente que a papaína, e a baixa viscosidade poderia estar relacionada à clivagem de cadeias longas do colágeno, e conseqüentemente produção de colágeno hidrolisado.

5.2.3. Baixa Massa Molecular

Analisando a Figura 9, pode-se observar que nos tratamentos com alcalase quando utilizados 0,5 g/100g de enzima, houve uma diminuição do fracionamento com o aumento do tempo de hidrólise, porém não houve diferença visível nas bandas formadas entre os tratamentos utilizando 0,5 g/100g de enzima por 4 h e os tratamentos utilizando 1 g/100g de enzima.

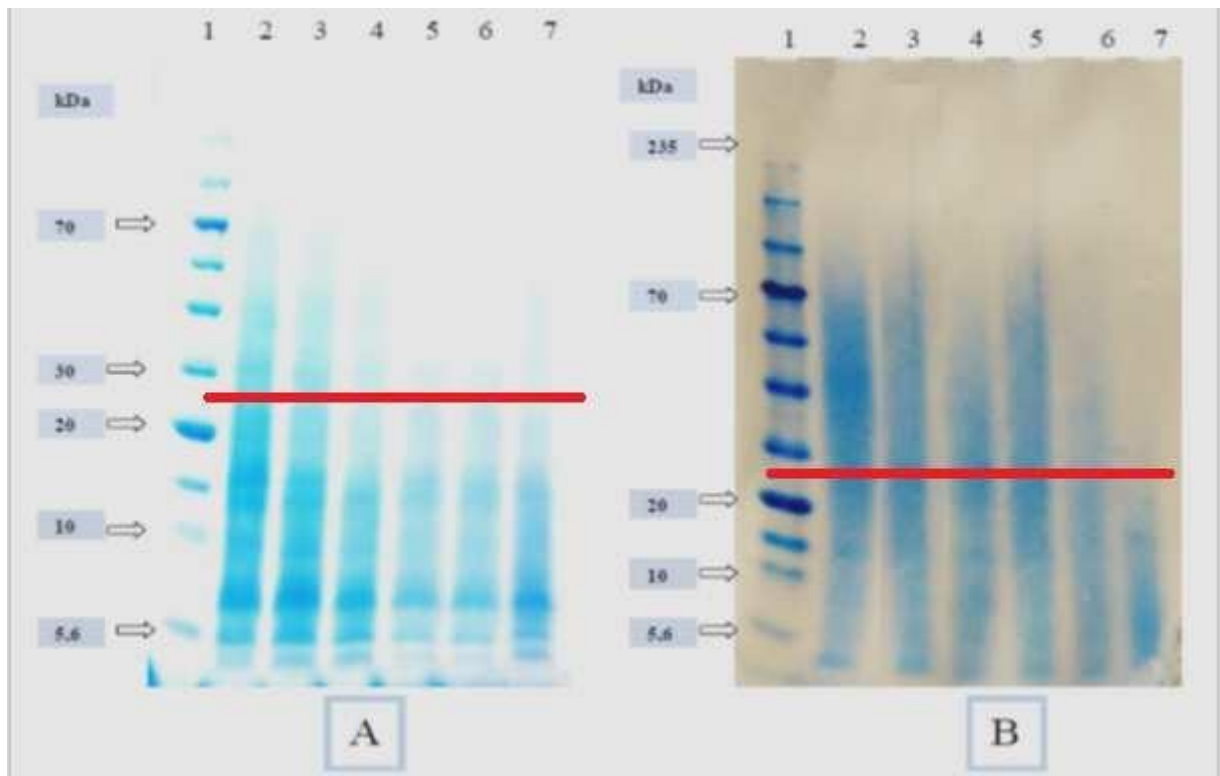


Figura 9 – Gel de eletroforese, (A) tratamento alcalase. (B) tratamento com papaína. (1) Mr, (2, 3 e 4) 0,5 g/100g E/S por 1, 2 e 4 h respectivamente, (5,6 e 7) 1 g/100g E/S por 1, 2 e 4 h respectivamente. (Linha vermelha \approx 25 kDa.)

Observando os tratamentos com papaína (Figura 9), nota-se um grande arraste em todos os tratamentos, portanto não é possível observar a presença de bandas. Observa-se também que quanto maior a concentração de enzima e o tempo de hidrólise, menor o intervalo de fracionamento. Esse fenômeno é bastante visível quando tratamentos se utiliza 1 g/100g de enzima, o que poderia explicar a baixa especificidade enzimática.

No trabalho de Damrongsakkul et al. (2008) o colágeno tratado com papaína formou gel, o que foi explicado pelo alto peso molecular obtido. As condições de hidrólise utilizadas foram diferentes das aplicadas neste trabalho, sendo que utilizaram menores concentrações de enzima, pH 6 e tempo máximo de 90 min, e concluíram que a papaína foi ineficiente na hidrólise do colágeno nas condições escolhidas pelos autores.

Ainda em relação à Figura 9, comparando os tratamentos realizados com alcalase e papaína, observa-se que a alcalase tende a ser mais estável, produzindo

bandas específicas mesmo quando utilizando menor concentração de enzima, e que o intervalo de bandas se manteve estável, apresentando bandas abaixo de 25 kDa em vários tratamentos. Portanto o único tratamento com papaína capaz de hidrolisar todo o colágeno abaixo de 25 kDa foi o mais drástico utilizando 1g/100g de enzima por 4 h de tratamento.

Em contextos gerais, durante o tratamento de hidrólise com as diferentes enzimas usadas neste trabalho, alguns fenômenos foram observados. Primeiramente em todos os tratamentos com alcalase, após 10 min de hidrólise não foi possível observar partículas sólidas em suspensão. O mesmo aconteceu com os tratamentos usando neutrase, onde após 1 hora de tratamento, toda a fibra em suspensão havia solubilizado. Esse fenômeno só foi observado com papaína após 4 h de tratamento com 1g/100g de enzima. Em todos os outros tratamentos com as enzimas pepsina, collagenase, tripsina e papaína, após incubação ainda era possível observar presença de partículas de colágeno em suspensão, que foram solubilizadas somente após tratamento térmico de inativação.

Zhang et al. (2013) hidrolisaram colágeno utilizando várias enzimas, e na hidrólise com alcalase, observou fenômeno parecido com o observado neste trabalho, onde em apenas 10 min após adição da enzima, todo o colágeno havia sido digerido, e a solução apresentava-se límpida e aparentemente com baixa viscosidade.

Todos os tratamentos após inativação e resfriamento formaram gel, exceto os tratamentos com alcalase, neutrase e o tratamento com papaína a 1g/100g de enzima por 4 h. Esse fenômeno pode ter ocorrido pelo uso do tratamento térmico de inativação que desnaturou o colágeno, e pelo alto peso molecular apresentado após tratamento.

No trabalho de Damrongsakkul et al. (2008) o colágeno tratado com papaína formou gel, o que foi explicado pelo alto peso molecular obtido. Porém as condições de hidrólise utilizadas foram diferentes das aplicadas neste trabalho, sendo que utilizou menores concentrações de enzima, pH 6 e tempo máximo de 90 min, e concluíram que a papaína foi ineficiente na hidrólise do colágeno nas condições escolhidas pelos autores.

Os géis utilizados na eletroforese apresentaram um pequeno arraste de proteínas, o que dificultou a interpretação das frações produzidas. Parte do arraste pode ser resultado de frações que não haviam atingido a hidrólise final, ou seja, o processo foi interrompido antes que a hidrólise estivesse completa, produzindo assim fragmentos de diversos tamanhos. Podemos ainda considerar que o tratamento

térmico empregado neste trabalho para inativação da enzima a 90°C, que pode ter desnaturado as proteínas e contribuído para esse fenômeno de arraste.

Bastiani et al. (2014) também realizaram em seu trabalho uma hidrólise acida e enzimática do colágeno da pele bovina, onde não observaram bandas claramente visíveis e quando comparando com outros trabalhos se mesmo escopo, puderam concluir que o processo de hidrólise diminui a visualização dessas bandas de proteína.

6. CONCLUSÃO

Conclui-se que a enzima alcalase foi a mais eficiente e estável na hidrólise do colágeno da raspa do couro bovino, produzindo frações peptídicas inferiores a 25 kDa, mesmo em menor concentração E/S. A papaína se mostrou a mais instável dentre as enzimas testadas, e bastante dependente do tempo e concentração E/S, produzindo frações peptídicas abaixo de 25 kDa apenas no tratamento com 1 g/100g E/S por 4 h. As duas enzimas mostraram potencial para produção de colágeno hidrolisado. Estudos mais aprofundados devem ser realizados com ambas as enzimas para caracterizar o hidrolisado produzido, e posteriormente determinar suas aplicações comerciais.

REFERÊNCIAS

AIGNER, Thomas; GELSE, Kolja; POSCHL, Ernst. Collagens Structure, Function, and Biosynthesis. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 55, p. 1531–1546, 2003.

ANGELINI, Ana Paula Ribeiro. **Quantificação do Colágeno, da Composição Centesimal e Estudo do Balanço de Massa dos Nutrientes Declarados, na Avaliação da Qualidade de Salsichas**. 92 f. Dissertação (Mestrado) - Pós-Graduação em Ciência de Alimentos, Faculdade de Farmácia da UFMG, Belo Horizonte, MG, 2011.

Atlas de Histologia Vegetal e Animal. Disponível em: <http://webs.uvigo.es/mmegias/5-celulas/2-componentes_proteinas.php> Acesso em: 18 fev. 2015.

BASTIANI, Glaucia V.; HOEHNE, Lucélia; LIMAS, Christina V. S. Hidrólise Enzimática e Ácida da Pele Bovina. **Caderno pedagógico, Lajeado**, v. 11, n. 1, p. 53-67, 2014.

BRASIL. Lei Nº 11.211, de 19 de dezembro de 2005. **Diário Oficial da União República Federativa do Brasil**, Brasília, DF, 20 dez.2005. Disponível em: <http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/_Ato2004-2006/2005/Lei/L11211.htm>. Acesso em: 25 fev. 2015.

BRUYERE, O. et al. Effect of Collagen Hydrolysate in Articular Pain: A 6-month randomized, double blind, placebo-controlled study. **Complementary Therapies in Medicine**, v.20, p. 124-130, 2012.

CELESTINO, Paulo. **O Petisco da Vez**. Revista Pet Food Brasil. v.2, p.30-43, Editora Stilo. São Paulo. Ano 2. Edição 10. Out. 2010.

CICB; APEX-BRASIL – Brazilian Leather Book. Disponível em: <http://issuu.com/iconographic/docs/brazilian_leather_book_-_2nd_editio/10?e=4514343/7279280>. Acesso em: 08 set. 2016.

DAMRONGSAKKUL, Siriporn; RATANATHAMMAPAN, Kongpob; KOMOLPIS, Kittinan; TANTHAPANICHAKOON, Wiwut. Enzymatic Hydrolysis of Rawhide Using Papain and Neutrase. **Journal of Industrial and Engineering Chemistry**, v. 14, p.202–206, 2008.

DIAMANTINO, Íris Martins. **Efeito de Substitutos de Gordura na Qualidade de Queijo Prato com Reduzido Teor de Gordura**. Dissertação de mestrado; São José do Rio Preto (SP) - Universidade Estadual Paulista, 2011.

FARIA, Mariza; COSTA, Elizabete L.Da.; GONTIJO, Jose A.R.; NETTO, Flavia M. Evaluation of The Hypotensive Potential of Bovine and Porcine Collagen Hydrolysates. **Journal of Medicinal Food**. V.11, n.3, p.560-567, 2008.

GOISSIS, Ana Paula Abdalla. **Análise Estrutural do Colágeno Tipo I. Correlação Estrutura: Atividade Biológica**. 98f. Dissertação (Mestrado) - pós-Graduação Interunidades Bioengenharia, Instituto de química de São Carlos. São Paulo, 2007.

GÓMEZ-GUILLÉN, María C.; GIMÉNEZ, Begoña; LÓPEZ-CABALLERO, María E.; MONTERO, M.Pilar. Functional and Bioactive Properties of Collagen and Gelatin from Alternative Sources: A review. **Food Hydrocolloids**, Madrid, v. 25, p. 1813-1827, feb.2011.

GUILLERMINET, Fanny et al. Hydrolyzed Collagen Improves Bone Metabolism and Biomechanical Parameters in Ovariectomized Mice: An in vitro and in vivo study. **Bone**. v. 46, p. 826-844, oct. 2009.

JANG, Aera; LEE, Mooha. Purification and Identification of Angiotensin Converting Enzyme Inhibitory Peptides from Beef Hydrolysates. **Meat Science**, v.69, p. 653–661, 2005.

KIELING, Dirley Diedrich. **ENZIMAS: Aspectos gerais**. Trabalho apresentado ao curso de engenharia bioquímica – Departamento de Engenharia Química e Engenharia de Alimentos – Universidade Federal de Santa Catarina – Florianópolis – SC – 2002.

KIM, Se-Kwon; MENDIS, Eresha; RAJAPAKSE, Niranjan. Antioxidant Properties of a Radical-Scavenging Peptide Purified from Enzymatically Prepared Fish Skin Gelatin Hydrolysate. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, v. 53, n. 3, p. 581-587, 2005.

KOUGUCHI, Tomomi; ZHANG, Youzuo; SATO, Mikako; TAKAHATA, Yoshihisa; MORIMATSU, Fumiki. Chicken Collagen Hydrolysate. In: Vasoprotective Effect of Foods as Treatments. **Atherogenesis**. Japan: Nippon Meat Packers, Inc., R & D Center, p.557-570, 2012.

LAEMMLI, Ulrich K. Cleavage of Structural Proteins During the Assembly of the Head of Bacteriophage T4. **Nature**, v. 227, p. 680-685, 1970.

MOSKOWITZ, Roland W. Role of Collagen Hydrolysate in Bone and Joint Disease. **Seminars in Arthritis and Rheumatism**. V.30, n. 2, p. 87-99, Oct. 2000.

NOKE, K.; SHIPMAN, J. Upholstery Leather. **SATRA Technology**. Disponível em: <http://www.satra.co.uk/spotlight/article_view.php?id=283> Acesso em: 25 fev.2015.

OLIVEIRA, Diana Q.L. et al. Seção IX- Poluição do Solo e Qualidade Ambiental: Utilização de Resíduos da Indústria de Couro como Fonte Nitrogenada para o Capim-elefante. **Revista Brasileira de Ciências do Solo**, v. 32, p. 417-424, 2008.

PACHECO, José W. F.. Curtumes . Produção Mais Limpa. **CETESB**. São Paulo, p. 76, 2005. Disponível em: <<http://www.cetesb.sp.gov.br>>. Acesso em:10 out. 2014.

PEDROSO, Maitê G.V..**Estudo Comparativo de Colágeno Hidrolisado e Comercial com Adição de PVA**. 70 f. Dissertação (Mestrado) – Pós-graduação em química analítica – Instituto de Química de São Carlos. São Paulo, 2009.

PRESTES, Rosa C. Colágeno e Seus Derivados: Características e Aplicações em Produtos Cárneos. **UNOPAR Científica Ciências Biologia e da Saúde**. Santa Maria, v. 15, n. 1, p. 65-74, mar. 2012.

PRESTES, Rosa C. et al. Caracterização da Fibra de Colágeno, Gelatina e Colágeno Hidrolisado. **Revista Brasileira de Produtos Agroindustriais**, Campina Grande, v.15, n.4, p.375-382, 2013.

RAMACHANDRAN, Gopalamudran N. **TREATISE ON COLLAGEN: Chemistry of Collagen**. University of Madras, India, v. 1, 1967.

RODRIGUES, Vergimari. **Análise do Efeito do Colágeno Bovino e Derivados na Proliferação Celular e Biossíntese de Colágeno em Fibroblastos Humano**. 133 f. Dissertação (Mestrado) - Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia, Instituto Butantan. São Paulo, 2009.

SCHAUSS, Alexander G. et al. Effect of the Novel Low Molecular Weight Hydrolyzed Chicken Sternal Cartilage Extract, BioCell Collagen, on Improving Osteoarthritis-Related Symptoms: A Randomized, Double Blind, Placebo-Controlled Trial. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, v.60, p.4096-4101, oct. 2012.

SCHRIEBER, Reinhard; GAREIS, Herbert. **Gelatine Handbook: Theory and Practice**. Weinheim. 2007.

SHOULDERS, Matthew D.; RAINES, Ronald T. Collagen Structure and Stability. **Annual Review of Biochemistry**, v. 78, p. 929-958, apr. 2009.

SIMÕES, Gislaine Silveira. **Aproveitamento de Subproduto de Frigoríficos: Extração, isolamento e caracterização de colágenos de túnica albugínea de suínos imunocastrados**. 2013. 119f. Tese (Doutorado em Ciência de Alimentos) Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2013.

SMITH, J.W. Molecular Pattern in Native Collagen. **Nature**, v.219, p.157-63, 1968.

SHIGEMURA, Y. et al. Dose-dependent changes in the levels of free and peptide forms of hydroxyproline in human plasma after collagen hydrolysate ingestion. **Food Chemistry**, p. 328-332, 2014.

SUNDAR, Victor J. et al. Recovery and Utilization of Proteinous Wastes of Leather Making: a review. **Reviews in Environmental Science and Biotechnology**, v. 10, p. 151-163, oct. 2010.

WANG, W.; LI, Z.; LIU, J.Z.; WANG, Y.J.; LIU S.H.; SUN, M. Comparison between thermal hydrolysis and enzymatic proteolysis processes for the preparation of tilapia skin collagen hydrolysates. **Czech J. Food Sci.** v. 31, n. 1, p. 1–4, 2013.

WILSON, Keith; WALKER, Jonh. **Electrophoretic Techniques**. Principles and Thechiques of Biochemistry and Molecular Biology. Cambridge University Press UK, v. 70, p. 399-420, 2010.

WOESSNER, Jr. Frederick. The Determination of Hidroxyproline in Tissue and Protein Samples Containing Small Proportions of This Amino Acid. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v.93, p.440-447, 1961.

ZAGUE, Vivian. A New View Concerning the Effects of Collagen Hydrolysate Intake on Skin Properties. **Archieves of Dermatological Research**, p. 300, 479-483, 2008.

ZAGUE, V. et al. Collagen Hydrolysate Intake Increases Skin Collagen expression and suppresses Matrix Metalloproteinase 2 Activity. **Journal of Medicinal Food**. V.14, n.6, p. 618-624, 2011.

ZHANG, H. et al. Preventive Effects of Collagen Peptide from Deer Sinew on Bone Loss in Ovariectomized Rats. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, p. 1-9, 2014.

ZHANG, Yuhao; OLSEN, Karsten; GROSSI, Alberto; OTTE, Jeanette. Effect of pretreatment on enzymatic hydrolysis of bovine collagen and formation of ACE-inhibitory peptides. **Food Chemistry**, v. 141, p. 2343–2354, 2013.

ZHANG, Zhongkai; LI, Guoying; SHI, Bi. Physicochemical Properties of Collagen, Gelatin and Hidrolysate Derived from Bovine Limed Split Wastes. **Journal of the Society of Leather Technologists and Chemists**, v. 90, p. 23-28, 2005.

ZHOU, Peng; LIU, Dason; LIANG, Li; REGENSTEIN, Joe M. Extraction and characterisation of pepsin-solubilised collagen from fins, scales, skins, bones and swim bladders of bighead carp (*Hypophthalmichthys nobilis*). **Food Chemistry**, v. 133, p. 1441-1448, 2012.

ZIEGLER, Fabiane F.; SGARBIERI, Valdemiro C. Caracterização Químico-nutricional de um Isolado Proteico de Soro de Leite, um Hidrolisado de Colágeno Bovino e Misturas dos Dois Produtos. **Revista de Nutrição**, v.22, n.1, p.61-70, 2009.