

Otimização da extração de colágeno a partir de tendões bovinos pela metodologia de superfície de resposta

Ana Cláudia Silveira Alexandre¹, Caíque Rabelo Faria², Leandro José dos Santos³

Resumo

O mercado de carne bovina está em constante crescimento, em consequência disso, uma maior quantidade de resíduos são produzidos diariamente. A quantidade de matéria orgânica advinda desses resíduos contribui para o agravamento do impacto ambiental, devido ao seu elevado potencial poluidor. O aproveitamento destes coprodutos para a extração de colágeno é uma alternativa viável para agregar valor à matéria-prima e principalmente contribuir para a sustentabilidade na indústria de alimentos. O objetivo deste estudo foi a otimização da extração de colágeno de tendão bovino por meio da variação de dois parâmetros nas extrações, a concentração de ácido acético e o tempo das extrações. O material obtido foi caracterizado por espectrometria na região do infravermelho e análises físico-químicas. Os rendimentos das extrações variaram entre 1,42 e 10,75%, sendo próximos ao obtido na literatura partindo de outros coprodutos. Entretanto após a adaptação da metodologia foi possível obter o colágeno com rendimento de 36%, superior ao relatado para muitos coprodutos. A melhor condição da extração foi utilizando uma concentração de 2 mol.L⁻¹ de ácido acético, com o tempo de 30 horas a temperatura ambiente.

Palavras-chave: Colágeno solúvel em ácidos. Coprodutos. Delineamento Composto Central Rotacional.

Optimization of conditions for extraction of collagen from bovine tendon by response surface methodology

Abstract

The bovine meat market is constantly growing. As a result, a larger amount of organic residues is produced daily. The amount of organic matter contained in such residues contributes to the worsening of the environmental impact because of their high polluting potential. The use of these by-products for extraction of collagen is a viable alternative to increase the value of raw materials and contribute for sustainability in the food industry. The objective of this study was to optimize the extraction of bovine tendon collagen by varying two parameters in the process: the acetic acid concentration and the duration of the extraction. The material was characterized by infrared spectrometry and physicochemical analyses. Extraction yields ranged between 1,42 and 10,75%, which is similar to that reported in the literature from other by-products. However, after adaptation of the method, collagen was obtained with a yield of

¹Mestranda em Ciência e Tecnologia de Alimentos - Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri, Diamantina, Minas Gerais, Brasil.

*Autora para correspondência: anaclaudiaaal@outlook.com

²Engenheiro de Alimentos. Universidade Federal de Viçosa, Florestal, Minas Gerais, Brasil.

³Docente Orientador – Instituto de Ciências Exatas - Universidade Federal de Viçosa, Florestal, Minas Gerais, Brasil.

Recebido para publicação em 15 de novembro de 2017

Aceito para publicação em 15 de dezembro de 2017

36%, higher than that reported for many by-products. The best condition for the extraction involved the extraction with 2 mol.L⁻¹ of acetic acid during 30 hours at room temperature.

Keywords: Acid-soluble collagen. By-products. Rotacional Central Composite Design.

Introdução

O Brasil é um dos líderes mundiais no mercado de carne bovina, estando entre os principais exportadores, além de ser o segundo maior consumidor global, atrás apenas dos Estados Unidos. De acordo com dados da Associação Brasileira das Indústrias Exportadoras de Carne – ABIEC (2015), a quantidade total exportada para os diversos países passou de 1.512.736 toneladas no ano de 2013 para 1.565.308 toneladas no ano de 2014. No mercado mundial, o Brasil é responsável por 20% do *market share* de carne bovina em relação ao peso de carcaça equivalente (ABIEC, 2015; USDA, 2014; BRANDÃO, 2013).

A grande quantidade de resíduos orgânicos gerada nas diversas etapas da cadeia produtiva de bovinos de corte representa um problema ambiental para a sociedade e um problema econômico para a indústria. Uma alternativa para o aproveitamento de resíduos consiste no desenvolvimento de novos produtos que os utilizem, garantindo um destino mais nobre e que agregue valor a eles. Devido à tendência de utilização de colágeno em substituição aos agentes sintéticos nos diversos processos industriais, observa-se um crescente interesse pelo processo de extração desta proteína. Além de permitir uma maior valorização dos coprodutos, contribui para uma produção mais sustentável e limpa (PRESTES *et al.*, 2013; PRESTES, 2012; GÓMEZ-GUILLÉN *et al.*, 2011; ROQUE; SELL, 2004).

O colágeno é a proteína mais abundante nos animais, sendo a principal do tecido conjuntivo e encontrada em várias partes da estrutura biológica animal. Devido às suas características como umidificante, melhorador de textura e valor nutricional, extensor, emulsificante, estabilizante, formador de filmes, transportador de substâncias; e suas propriedades tais como solubilidade, compressibilidade, transparência e baixa alergenicidade, o colágeno apresenta grande potencial de aplicação na indústria de alimentos (DENIS *et al.*, 2008).

O colágeno parcialmente hidrolisado, também conhecido como gelatina, é obtido do

colágeno nativo por meio da hidrólise ácida ou alcalina (GÓMEZ-GUILLÉN *et al.*, 2002). A gelatina é uma mistura heterogênea de polipeptídios que são obtidos pela hidrólise do colágeno. Depois de ser submetida à hidrólise enzimática, este colágeno recebe a denominação de colágeno hidrolisado (OESSER *et al.*, 1999). O grau de conversão do colágeno em gelatina está relacionado com o pré-tratamento químico empregado e com os fatores que interferem no processo de extração, como pH, temperatura e tempo de extração (GÓMEZ-GUILLÉN *et al.*, 2011). Neste contexto, o presente trabalho teve por objetivo avaliar as condições mais favoráveis para extração de colágeno utilizando tendões bovinos, coproduto da indústria de alimentos.

Material e métodos

Os experimentos foram realizados no Laboratório de Análise de Alimentos e no Laboratório de Química – Solos da Universidade Federal de Viçosa, *Campus* Florestal. Os tendões foram fornecidos pela indústria frigorífica Plena Alimentos e Abatedouro Soberano, ambos localizados na cidade de Pará de Minas, e pelo Matadouro Municipal de Itaúna, localizado na cidade de Itaúna.

O experimento utilizou a metodologia do Delineamento Composto Central Rotacional (DCCR) em dois níveis (2²), com quatro pontos axiais e cinco repetições no ponto central (PC) para estimativa do erro experimental, com dois fatores (concentração de ácido acético e tempo), totalizando 13 unidades experimentais. Os resultados foram analisados por meio da superfície de resposta para obtenção do ponto otimizado para extração do colágeno. Os valores limites dos parâmetros foram estipulados e superestimados de acordo com os experimentos de Cardoso (2005), Campos (2008), Wang e colaboradores (2008) e Pedroso (2009).

Alguns testes foram realizados (Metodologia A e B) para definição da metodologia utilizada (Metodologia C), em que 7,5 g do tendão foram utilizados para extração em diferentes condições de concentração de ácido acético e tempo.

Metodologia A

A extração do colágeno seguiu a metodologia proposta por Campos (2008), na qual foram utilizados tendões frescos. Esses foram cortados em cubos e moídos em aproximadamente 1 mm³ para aumento da superfície de contato. Em seguida, 7,5g do material foi imerso em uma solução de álcool 70% por uma hora para remoção da gordura presente no material de partida. Após este tempo, o material foi submetido a soluções de ácido acético (300 mL) em concentrações definidas pelo delineamento deste trabalho, bem como o tempo das extrações. Posteriormente, a solução foi centrifugada a 4000 rpm por 20 minutos para sedimentação do material em centrífuga CentriBio modelo 4000-12-15. Nesta etapa, o sobrenadante foi recolhido e o produto de fundo descartado. À solução recolhida foram adicionados 330 mL de uma solução salina (20%) para precipitação das proteínas, por meio do efeito *salting-out*. O precipitado nesta etapa é o colágeno, o qual foi separado e em seguida lavado com água destilada para retirada dos cristais de NaCl.

Metodologia B

Algumas alterações foram realizadas na metodologia deste trabalho visando obter maior rendimento nas extrações. Foi feita a adaptação da Metodologia A por meio do aumento do volume da solução de ácido acético. Na etapa de extração dobrou-se o volume da solução de ácido acético (600 mL) de todas as concentrações definidas, a fim de aumentar o volume de solução na etapa de centrifugação.

Metodologia C

Ao produto de fundo obtido na centrifugação da Metodologia A foram adicionados 300 mL de água destilada. Essa solução foi homogeneizada em um processador e novamente submetido a centrifugação.

Rendimento da extração

O cálculo do rendimento das extrações foi realizado com base na quantidade de colágeno extraído e na quantidade de tendão *in natura* úmido (inu) inicialmente utilizado (Equação 1), como proposto por Wang e colaboradores (2008).

$$\text{Rendimento} = \frac{m_{\text{colágeno extraído}}}{m_{\text{tendão inu}}} \cdot 100 \quad (1)$$

Análises físico-químicas

Os espectros na região do infravermelho foram obtidos a partir das amostras do material extraído e de amostras comerciais fornecidas pela NovaProm *Food Ingredients*, comparados entre si e com a literatura. Foi utilizado um espectrômetro Perkin-Elmer *Spectrum One FT-IR Spectrometer* de absorção na região do infravermelho para identificar as bandas de estiramento e deformação características dos resíduos de aminoácidos do colágeno.

As análises de umidade e proteína foram realizadas com o material extraído nos valores ótimos de concentração de ácido acético e tempo, e comparadas com a amostra comercial fibra em pó fornecida pela NovaProm *Food Ingredients*. Ambas foram realizadas em duplicata e de acordo com as metodologias propostas pelo Instituto Adolfo Lutz (2008).

Análise estatística

Após a coleta dos resultados experimentais realizaram-se as análises estatísticas no *software Statistica*, versão 8.0 (*Statsoft Inc., Tulsa, OK, USA*), em nível de significância de 5%. Análise de superfície de resposta foi realizada pela análise de regressão múltipla de uma equação polinomial de 2º grau (Equação 2), cujo modelo quadrático completo é expresso como:

$$Y = C_0 + \sum_{i=1}^2 C_i X_i + \sum_{i=1}^2 C_{ii} X_i^2 + \sum_{i=1}^2 \sum_{j<i}^2 C_{ij} X_i X_j \quad (2)$$

Onde Y são as variáveis respostas dependentes, C₀, C_i, C_{ii} e C_{ij} são os coeficientes da regressão e X_i e X_j são os fatores independentes codificados. A qualidade do ajuste da equação do modelo de 2º grau foi expressa pelo coeficiente de determinação (R²) e sua significância determinada pelo teste F.

Resultados e discussão

Extração

Inicialmente, utilizou-se o método de Campos (2008) com a variação da concentração de ácido acético e tempo de extração. O maior rendimento obtido nesse teste (Metodologia A) foi aproximadamente 10%. Entretanto, percebeu-se que grande quantidade do colágeno extraído era descartada na etapa de centrifugação, o que poderia explicar o baixo rendimento encontrado.

Para Metodologia B, o rendimento foi semelhante ao obtido pela Metodologia A. Em contrapartida, o rendimento obtido por meio da Metodologia C foi

próximo a 36% e a Tabela 1 mostra os resultados obtidos.

Tabela 1 – Rendimentos obtidos para as diferentes condições estudadas

Extrações	Codificação (X_i)	[Ácido acético] (M)	Codificação (X_j)	Tempo (h)	Rendimento (%)
E1	-1	0,72	-1	17,27	28,0
E2	1	1,78	-1	17,27	30,7
E3	-1	0,72	1	42,73	29,3
E4	1	1,78	1	42,73	32,9
E5	-1,41	0,50	0	30	32,5
E6	1,41	2,00	0	30	36,0
E7	0	1,25	-1,41	12	32,4
E8	0	1,25	1,41	48	31,6
E9	0	1,25	0	30	31,2
E10	0	1,25	0	30	30,9
E11	0	1,25	0	30	30,0
E12	0	1,25	0	30	31,2
E13	0	1,25	0	30	31,3

Fonte: Elaborada pelos autores, 2017.

O ácido acético foi escolhido por se tratar de um ácido orgânico, apresentar alta solubilização do colágeno e custo relativamente baixo. Vários autores em seus trabalhos obtiveram maiores rendimento quando utilizaram ácido acético para extração deste tipo de material, como é o caso de Caputo e colaboradores (2012), Wang (2008) e Skierka e Sadowska (2007). Ainda, nas concentrações utilizadas o mesmo não se mostra um forte agente poluidor.

A presença de cargas na superfície da proteína é fundamental para que ocorra a precipitação do colágeno. A precipitação salina ocorre devido às interações das fibrilas de colágeno com os íons sódio (Na^+) e cloro (Cl^-) em solução. As interações químicas catalisadas por esses íons ocasionam a agregação das fibrilas de colágeno à medida que a solução salina é adicionada. Os respectivos íons interagem com as cargas positivas e negativas oriundas dos resíduos de aminoácidos presentes na superfície das fibrilas (LANDIS; SILVER, 2002).

Considerando a revisão bibliográfica realizada neste estudo, não foi encontrado na literatura rendimento da extração de colágeno de tendões bovinos. Vários trabalhos com tendões bovinos são realizados com outras finalidades como é caso de Campos (2008), que extrai colágeno e estuda sua funcionalidade para regeneração óssea. Em outros trabalhos, como o de Pedroso (2009), o colágeno comercial e o extraído são comparados por meio de análises físico-químicas. No estudo realizado por Wang e colaboradores (2008) a extração de colágeno a partir de pele de carpa obteve um rendimento de 19,7 % na extração otimizada. No estudo de Sadowska, Kolodziejska e Niecikowska (2003), um rendimento de 20 % foi obtido com utilização de pele de bacalhau.

Análise estatística

A equação do modelo gerada a partir da metodologia de superfície de resposta, para valores decodificados da variável independente (rendimento) é apresentada na Equação 3.

$$Y = 32,3612 - 6,634 X_i + 3,314 X_i^2 + 0,047 X_j - 0,001 X_j^2 + 0,033 X_i X_j \quad (3)$$

Em que: Y é a variável resposta, R² é o coeficiente de determinação, X_i é a concentração

de ácido acético e X_j é o tempo de extração.

Os valores destacados na tabela abaixo foram significativos a um intervalo de confiança de 95%. Foi realizada uma análise de variância (ANOVA) a partir das variáveis significativas, que é apresentada na Tabela 2.

Tabela 2 – Análise de variância para rendimento (Y)

Fontes de variação	Soma dos Quadrados	Graus de liberdade	Quadrado médio	F	P
Concentração de ácido acético linear (M)	15,82523	1	15,82523	52,84414	0,001902
Concentração de ácido acético quadrático (M)	6,06186	1	6,06186	20,24196	0,010830
Tempo linear (h)	0,66842	1	0,66842	2,23202	0,209481
Tempo quadrático (h)	0,22254	1	0,22254	0,74310	0,437283
Interação	0,20250	1	0,20250	0,67619	0,457092
Falta de ajuste	19,96985	3	6,65662	22,22799	0,005890
Erro puro	1,19788	4	0,29947		
Total	44,55888	12			

Fonte: Elaborada pelos autores, 2017.

O valor obtido para o R² foi de 0,53, o que indica que 53% da variabilidade na resposta pode ser explicada pelo modelo. Este valor é considerado suficiente para obtenção de um modelo válido e útil para fins preditivos, de acordo com Callegari-Jacques (2003), que considera um valor forte de correlação entre 0,6 e 0,9. O valor do coeficiente de correlação obtido para este modelo foi de 0,73. Entretanto, a falta de ajuste foi significativa (p<0,05) evidenciando assim, que o modelo não pode ser utilizado para fins preditivos. A existência da falta de ajuste pode estar relacionada com a não uniformidade do processo de agitação.

Segundo Comparini e colaboradores (2009), quando há falta de ajuste significativa (p<0,05), o modelo a ser utilizado deverá ser de ordem maior. Além da falta de ajuste, a concentração de ácido acético (mol.L⁻¹) linear e quadrática também apresentaram efeito significativo (p<0,05).

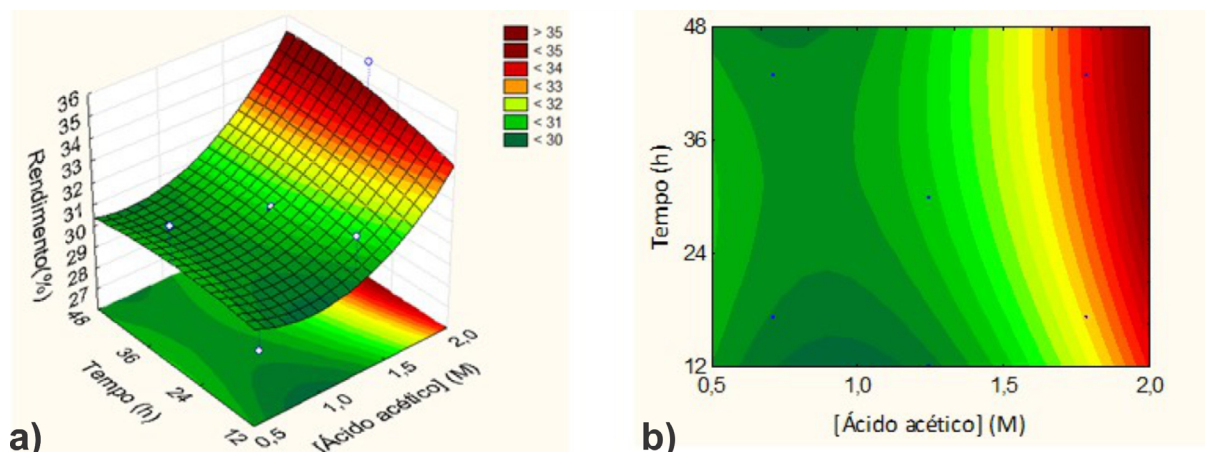
Apesar dos resultados obtidos não proporcionarem a geração de um modelo matemático, foi gerada uma superfície de resposta juntamente com um gráfico de contorno, demonstrando a tendência do processo (Figura 1).

Por meio da superfície de resposta e do gráfico de contorno é possível observar que em maiores concentrações de ácido acético e em tempos maiores de extração estudados (região vermelho escuro) tem-se um maior rendimento.

A Figura 2-a igualmente indica que a variável concentração de ácido acético exerceu maior influência nas extrações, uma vez que o maior rendimento experimental (E6, Tabela 1) foi observado em valores de maior concentração, quando analisados no mesmo tempo, o que pode ser confirmado também na Figura 1.

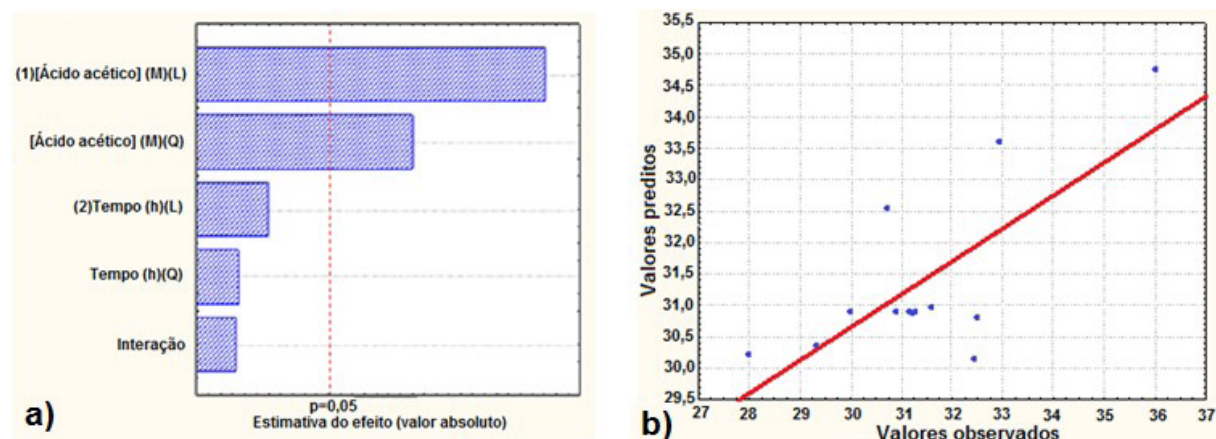
De acordo com Calado e Montgomery (2003) o diagrama de Pareto (Figura 2-a) apresenta de forma rápida e clara os efeitos que são estatisticamente importantes. Os tratamentos cujos retângulos estiverem à direita da linha divisória (p=0,05) devem ser considerados no modelo matemático. Os valores ao lado do retângulo representam os valores da estatística de teste t, obtidos na janela dos tratamentos principais.

Figura 1 – Gráfico de superfície de resposta (a) e de contorno (b) para avaliação do rendimento da extração de colágeno em função do tempo e da concentração de ácido acético.



Fonte: Elaborada pelos autores, 2017.

Figura 2 – Gráfico de Pareto sobre o efeito do tempo e da concentração de ácido acético na extração de colágeno (a) e valores observados versus valores preditos (b)



Fonte: Elaborada pelos autores, 2017.

Por meio da relação linear existente entre as variáveis é possível estimar a linha de regressão, juntamente com os valores preditos (Figura 2-b). É possível notar que para que tivesse um ajuste do modelo aos dados, os valores obtidos deveriam sobrepor a linha de regressão.

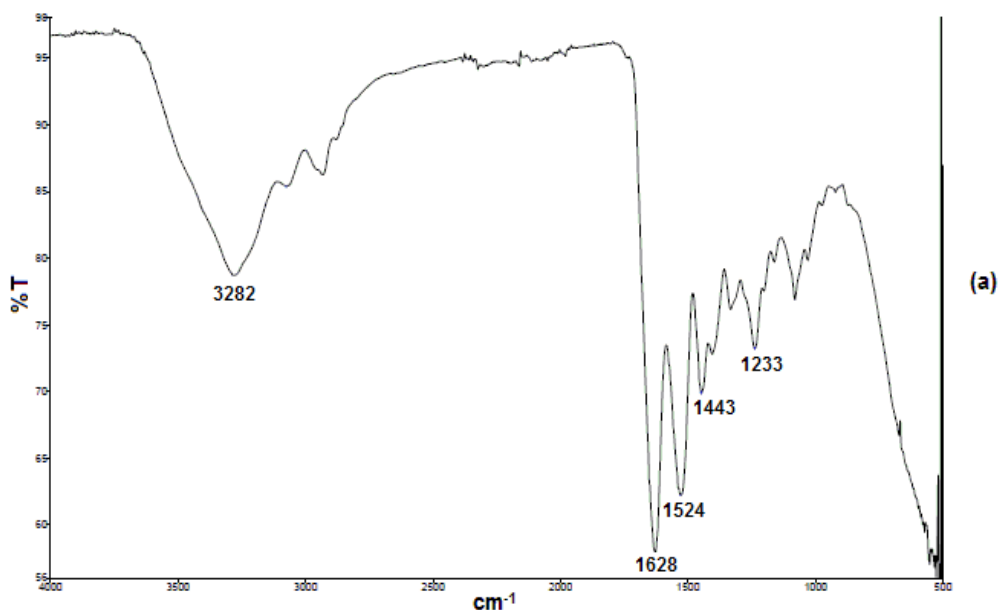
De acordo com o valor observado para o coeficiente de determinação (R^2) e da falta de ajuste significativa ($p < 0,05$) é possível concluir que o modelo não explica os dados e é incapaz de prever qualquer dado a respeito da variável resposta (rendimento).

Mesmo o modelo não sendo capaz de prever os dados estudados, análises físico-químicas foram realizadas com o intuito de comparar as amostras obtidas com amostras comerciais e dados da literatura.

Caracterização espectroscópica e físico-química

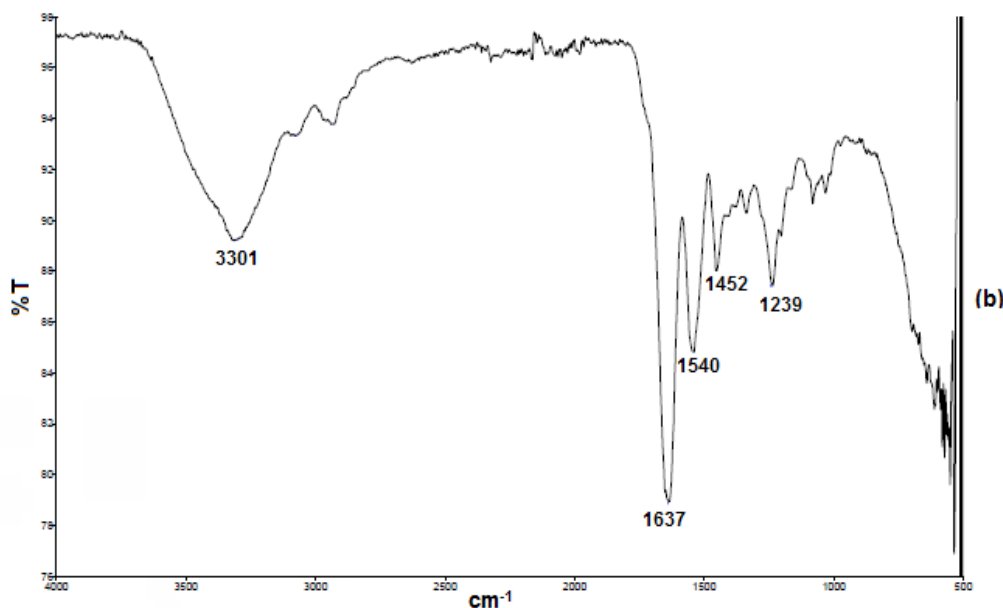
Os espectros de absorção na região do infravermelho das amostras comerciais de colágeno fibra em pó e em fibra e da amostra extraída são mostrados nas Figuras 3, 4 e 5.

Figura 3 – Espectro de absorção na região do infravermelho da amostra de colágeno comercial fibra em pó



Fonte: Elaborada pelos autores, 2017.

Figura 4 – Espectro de absorção na região do infravermelho da amostra de colágeno comercial em fibra

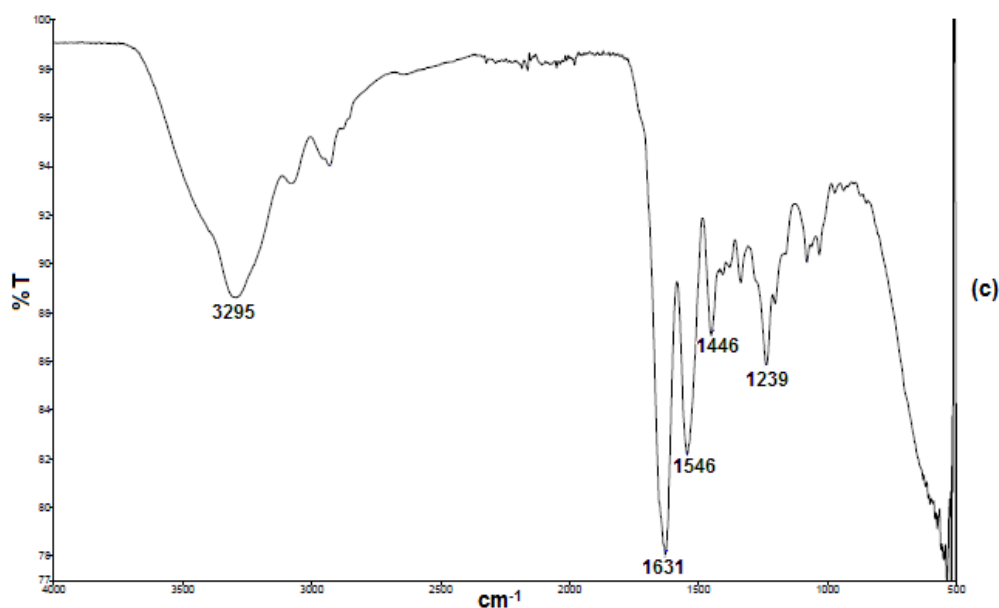


Fonte: Elaborada pelos autores, 2017.

Os espectros na região do infravermelho para as amostras de colágeno apresentaram as principais bandas características em 1239 cm^{-1} , devido ao estiramento da ligação C-N e vibração N-H, que são sensíveis à alterações na estrutura secundária do tropocolágeno (tripla hélice); em 1446 cm^{-1} , correspondente a vibrações dos anéis pirrolidínicos da prolina e hidroxiprolina que tem sua intensidade independente das variações estruturais da matriz do colágeno. A integridade

da estrutura secundária do tropocolágeno (tripla hélice) pode ser observada por meio da razão entre as intensidades dos sinais próximos a 1235 e 1450 cm^{-1} , referentes aos anéis pirrolidínicos. A razão entre essas absorvâncias ou transmitâncias deve ser próxima a 1 ou 1,1, pois valores próximos de 0,6 representam estruturas desnaturadas (LACERDA; PLEIPIS; GOISSIS, 1998; BET; GOISSIS; LACERDA, 2001).

Figura 5 – Espectro de absorção na região do infravermelho da amostra de colágeno extraída

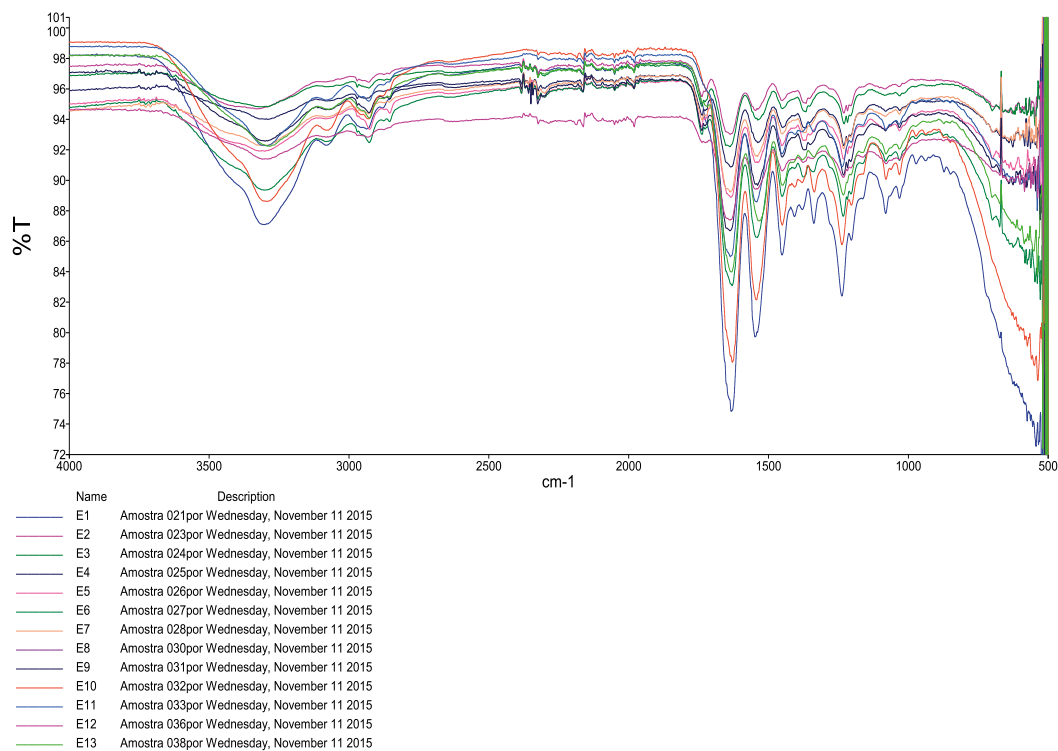


Fonte: Elaborada pelos autores, 2017.

Outras bandas características da estrutura do colágeno são mostradas em 1631 cm^{-1} , que pode ser atribuída ao estiramento da carbonila (C=O) e próximo a 3295 cm^{-1} , devido ao estiramento da ligação O-H presente em ácido carboxílico (SIONKOWSKA *et al.*, 2004).

Os espectros de absorção na região do infravermelho das amostras obtidas nas 13 extrações realizadas neste estudo são apresentados na Figura 6.

Figura 6 – Espectros de absorção na região do infravermelho das amostras extraídas nas diferentes condições estudadas.



Fonte: Elaborada pelos autores, 2017.

A fim de avaliar a integridade da estrutura secundária do tropocolágeno, calcularam-se as razões entre as intensidades das bandas 1239

$\text{cm}^{-1}(\%T1)/1446 \text{ cm}^{-1}(\%T2)$ das amostras obtidas nas 13 extrações realizadas. Esses valores são mostrados na Tabela 3.

Tabela 3 – Razões entre as intensidades das bandas $1239 \text{ cm}^{-1}(\%T1)/1446 \text{ cm}^{-1}(\%T2)$ das amostras extraídas nas diferentes condições estudadas

Amostras extraídas	$\%T_1/T_2$
E1	0,966
E2	0,991
E3	0,991
E4	0,988
E5	0,991
E6	0,987
E7	0,991
E8	0,988
E9	0,987
E10	0,994
E11	0,990
E12	0,993
E13	0,991

Fonte: Elaborada pelos autores, 2017.

Por meio do perfil dos espectros na região do infravermelho analisados e da concordância dos valores descritos na literatura para as bandas características do colágeno, foi possível sugerir que o mesmo foi obtido e que a tripla hélice foi preservada no processo de extração, indicando que não ocorreu desnaturação do colágeno. De acordo com Karim e Bhat (2008) a integridade da tripla hélice do colágeno é essencial para a propriedade gelificante. Além disso, não foi observado aparecimento de novas bandas de absorção, sendo os espectros semelhantes para todas as amostras das 13 extrações realizadas, evidenciando que não houve influência dos tratamentos nos materiais extraídos.

O teor de umidade é um fator que interfere na qualidade do produto, uma vez que em altos teores de umidade, observa-se crescimento microbiano e uma série de reações bioquímicas. Os resultados mostraram que tanto o colágeno comercial em pó quanto a amostra extraída apresentaram valores próximos de teor de água (9,84% e 8,95%, respectivamente). Estes valores de umidade estão próximos a 9,25% encontrado por Wolf (2007) e também dentro dos valores de 6,7% e 12,3% encontrados por Prestes e colaboradores (2013).

O teor de proteína encontrado para a amostra extraída foi de 77,64%. Quando comparados com a literatura, os teores de proteína ficaram próximos aos 78,53% mencionados por Almeida (2012). Esses valores ficaram abaixo do encontrado para a amostra comercial fibra de colágeno em pó NovaProm *Foods Ingredientes* de 88,56%. No estudo realizado por Prestes e colaboradores (2013) também foi obtido o maior teor de proteína (97,39%) em amostra de fibra de colágeno em pó. De acordo com Roman e Sgarbieri (2007), a gelatina é um ingrediente que contém 84-85% de proteína, 9-12% de água e 1-3% de sais minerais, sendo os principais sódio e cálcio; podendo apresentar também traços de gordura.

Conclusão

O melhor método de extração foi com a utilização de uma concentração de ácido acético de 2 mol.L^{-1} e o tempo de 30 horas, cujo rendimento foi de 36%. O valor do coeficiente de determinação encontrado foi de 0,53 e devido a falta de ajuste significativa ($p < 0,05$) o modelo não deve ser utilizado para fins preditivos. Os resultados obtidos nas análises de umidade e proteína foram próximos aos mencionados por outros autores.

As análises espectroscópicas mostraram bandas características da estrutura do colágeno, além de fornecer informações que sugerem que não houve desnaturação da tripla hélice do mesmo. Entretanto, é importante que outros métodos de caracterização sejam realizados para sugerir que

a estrutura do colágeno foi preservada. A partir do produto obtido e após uma caracterização mais detalhada, o mesmo pode ser utilizado para tais aplicações, como emulsificante, estabilizantes, melhorador de textura entre outras.

Referências

- Associações Brasileiras das Indústrias Exportadoras de Carne - ABIEC. **Estatísticas - Exportações Brasileiras de Carne Bovina**. Disponível em: <<http://www.abiec.com.br/download/anual-2015.pdf>>. Acesso em: 30 out. 2017.
- ALMEIDA, P. F. **Análise da qualidade de gelatina obtida de tarsos de frango e aspectos envolvidos no processo produtivo**. 2012. 121 p. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Produção) - Universidade Nove de Julho, São Paulo, 2012.
- BET, M. R.; GOISSIS, G.; LACERDA, C. A. **Characterization of Polyanionic collagen prepared by selective hydrolysis of asparagine and glutamine carboxamide side chains**. *Biomacromolecules*, v. 2, p. 1074-1079, 2001.
- BRANDÃO, F. S. **Tendências para o consumo de carne bovina no Brasil**. 2013. 101 p. Tese (Doutorado em Agronegócios) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Porto Alegre, 2013.
- CALADO, V.; MONTGOMERY, D. **Planejamento de experimentos usando o Statistic**. Rio de Janeiro: E-papers, 2003.
- CALLEGARI-JACQUES, S. M. **Bioestatística: princípios e aplicações**. Porto Alegre: Artemed, 2003.
- CAMPOS, D. M. **Produção e caracterização de colágeno tipo I e de compósitos hidroxiapatita-colágeno para regeneração óssea**. 2008. 100 p. Dissertação (Mestrado em Ciências em engenharia metalúrgica e de materiais) - Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2008.
- CAPUTO, I. *et al.* An acetic acid-based extraction method to obtain high quality collagen from archeological bone remains. **Analytical Biochemistry**, v. 421, p. 92-96, 2012.
- CARDOSO, J. C. **Modificação do colágeno pela reação de Maillard e avaliação de formulações na forma gel desenvolvidas a partir do material modificado**. 2005. 152 p. Tese - Universidade de São Paulo, Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Ribeirão Preto, 2005.
- COMPARINI, A. *et al.* **Metodologia de superfície de resposta: Uma introdução nos softwares R e Statistica**. São Carlos: Icmc, 2009.
- DENIS, A. *et al.* Molecular weight determination of hydrolyzed collagens. **Food Hydrocolloids**, v. 22, p. 989-994, 2008.
- GÓMEZ-GUILLÉN, M. C. *et al.* Functional and bioactive properties of collagen and gelatin from alternative sources: A review. **Food hydrocolloids**, v. 25, p. 1813-1827, 2011.
- GOMÉZ-GUILLÉN, M. C. *et al.* **Structural and physical properties of gelatin extracted from different marine species: a comparative study**. *Food Hydrocolloids*, v.16, p. 25-34, 2002.
- INSTITUTO ADOLFO LUTZ. **Métodos físico-químicos para análise de alimentos**. Versão eletrônica./coordenadores Odair Zenebon, Neus Sadocco Pascuet e Paulo Tiglea. São Paulo: IMESP, 2008.
- KARIM, A. A.; BHAT, R. **Gelatin alternatives for the food industry: recent developments, challenges and prospects**. *Food Science and Technology*, v. 19, n. 12, p. 644-656, 2008.
- LACERDA, C.; PLEIPIS, A. M. G.; GOISSIS, G. Hidrólise seletiva de carboxiamidas de resíduos de asparagina e glutamina em colágeno: preparação e caracterização de matrizes aniônicas para uso como biomateriais. **Química Nova**, v. 21, n. 3, p. 267-271, 1998.
- LANDIS, W. J., SILVER, F. H. The structure and function of normally mineralizing avian tendons. **Comparative Biochemistry and Physiology - Part A: Molecular & Integrative Physiology**, v. 133, n. 4, p. 1135-1157, 2002.
- OESSER, S. *et al.* Oral administration of ¹⁴C labeled gelatin hydrolysate leads to an accumulation of radioactivity in cartilage of mice (C57/BL). **American Society for Nutritional Sciences**, v. 129, p. 1891-1895, 1999.
- PEDROSO, M. G. V. **Estudo comparativo de colágeno hidrolisado e comercial com adição de PVA**. 2009. 70 f. Dissertação (Mestrado em Química Analítica) - Instituto de Química da Universidade de São Paulo, São Carlos, 2009.
- PRESTES, R. C. Colágeno e Seus Derivados: Características e Aplicações em Produtos Carneos. **UNOPAR Científica Ciências Biológicas e da Saúde**, v. 15, n. 1, p. 65-74, 2012.
- PRESTES, R. C., *et al.* Caracterização da fibra de colágeno, gelatina e colágeno hidrolisado. **Revista Brasileira de Produtos Agroindustriais**, v. 15, n. 4, p. 375-382, 2013.
- ROMAN, J. A.; SGARBIERI, V. C. Caracterização Físico-química do Isolado Protéico de Soro de Leite e Gelatina de Origem Bovina. **Brazilian Journal of Food Technology**, v.10, n.2, p.137-143, 2007.
- ROQUE, V. F.; SELL, I. **Alternativas de utilização de resíduos gerados em frigoríficos de aves**. 2004. Disponível em: <http://www.abepro.org.br/biblioteca/ENEGEP1998_ART068.pdf>. Acesso em 15 de maio 2015.

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

SIONKOWSKA, A. *et al.* Collagen fibril formation in poly (vinyl alcohol) and poly (vinyl prolidone) films. **Journal of Molecular Liquids**, v. 144, n. 1-2, p. 71-74, 2009.

SKIERKA, E.; SADOWSKA, M. The influence of different acids and pepsins on the extractability of collagen from the skin of Baltic cod (*Gadus morhua*). **Food Chemistry**, v. 105, p. 1302-1306, 2007.

USDA - United States Department of Agriculture. **FAS - Foreign Agricultural Service. Livestock and Poultry: World Markets and Trade**. 2014. 22 p. Disponível em: <http://apps.fas.usda.gov/psdonline/circulars/livestock_poultry.pdf>. Acesso em: 15 de maio 2015.

WANG, L. *et al.* Optimization of conditions for extraction on acid-soluble collagen from grass carpe (*Ctenopharyngodon idella*) reponse surface methodology. **Innovative Food Science e Emerging Techonologies**, v. 9, n. 4, p. 604-607, 2008.

WOLF, K. L. **Propriedades físico-químicas e mecânicas de biofilmes elaborados a partir de fibras e pó de colágeno**. 2007. 101 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia e Ciência de alimentos) - Universidade Estadual Paulista. São José do Rio Preto, 2007.