

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA  
CENTRO DE CIÊNCIAS RURAIS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA DOS  
ALIMENTOS

Michele Mantelli Schmidt

**COLÁGENO DE FRANGO: UMA ALTERNATIVA PARA AGREGAR  
VALOR AOS SUBPRODUTOS DA INDÚSTRIA AVÍCOLA**

Santa Maria, RS  
2018

**Michele Mantelli Schmidt**

**COLÁGENO DE FRANGO: UMA ALTERNATIVA PARA AGREGAR VALOR  
AOS SUBPRODUTOS DA INDÚSTRIA AVÍCOLA**

Tese apresentada ao Curso de Doutorado do Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia dos Alimentos da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para a obtenção do grau de **Doutor em Ciência e Tecnologia dos Alimentos.**

Orientador: Prof<sup>o</sup> Dr. Ernesto Hashime Kubota

Co-orientadora: Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup>. Rosa Cristina Prestes Dornelles

**Santa Maria, RS, Brasil  
2018**

**Michele Mantelli Schmidt**

**COLÁGENO DE FRANGO: UMA ALTERNATIVA PARA AGREGAR VALOR  
AOS SUBPRODUTOS DA INDÚSTRIA AVÍCOLA**

Tese apresentada ao Curso de Doutorado do Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia dos Alimentos da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para a obtenção do grau de **Doutor em Ciência e Tecnologia dos Alimentos.**

**Aprovado em 24 de agosto de 2018:**

---

**Ernesto Hashime Kubota, Dr.**  
(Presidente/Orientador)

---

**Rogério Luis Cansian, Dr. (URI)**

---

**Silvana Maria Michelin Bertagnolli, Dr<sup>a</sup>. (UFN)**

---

**Cláudia Severo da Rosa, Dr<sup>a</sup>. (UFSM)**

---

**Marcio Antonio Mazutti, Dr. (UFSM)**

Santa Maria, RS  
2018

## AGRADECIMENTOS

A Deus, pela Sua presença em todos os momentos.

Aos professores Dr. Ernesto Hashime Kubota e Dr<sup>a</sup>. Rosa Cristina Prestes Dornelles, pela orientação, confiança e apoio. Obrigada por partilharem seus conhecimentos e contribuírem para minha formação.

Ao meu pai, por sua dedicação, amor e apoio incondicional, e pelo exemplo de força e caráter, te amo.

As minhas irmãs e melhores amigas, Carine e Gabriela, pelo carinho, pela cumplicidade e por estarem sempre ao meu lado.

A minha mãe, por sempre olhar por mim, e a minha segunda mãe, vó Julia, obrigado pela dedicação e carinho.

Ao meu namorado Dionatan, pelo amor, companheirismo, paciência, e acima de tudo, incentivo.

A toda minha família, obrigada por vocês existirem e estarem sempre ao meu lado.

Aos meus colegas de doutorado, pela amizade e apoio.

As meninas do laboratório 4211, em especial a Itamara, Anelise, Alessandra e Andrine, pela ajuda na realização deste trabalho, pelas discussões de dados e principalmente pela amizade, que tornou essa caminhada mais leve.

Aos professores e funcionários do DTCA pela ajuda e ensinamentos transmitidos.

Ao professor Dr. Renius Mello pela ajuda nas análises estatística e contribuições neste trabalho.

Ao professor Dr. Ivo Demiate, seus alunos e a UEPG, pela ajuda nas análises de FTIR, viscosidade e DSC. Ao professor Dr. Rogério Cansian, seus alunos e a URI, pela ajuda na eletroforese. Ao professor Dr. Marcio Mazzuti, por nos ceder seu laboratório para o uso da sonda de ultrassom.

Aos meus colegas de trabalho na UFSM, Adriane e Luiz Gustavo, e aos professores do curso de Tecnologia em Processos Químicos pelo apoio.

A empresa Cooperativa Central Aurora Alimentos (Chapecó, SC, Brasil), pela doação do resíduo de CMS e pelo apoio financeiro.

Ao Programa de Apoio aos Pólos Tecnológicos - Secretaria de Desenvolvimento Econômico, Ciência e Tecnologia do Rio Grande do Sul pelo apoio financeiro.

Ao CNPQ e CAPES pela bolsa de doutorado.

A todos que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho, muito obrigado.

## RESUMO

### COLÁGENO DE FRANGO: UMA ALTERNATIVA PARA AGREGAR VALOR AOS SUBPRODUTOS DA INDÚSTRIA AVÍCOLA

AUTORA: Michele Mantelli Schmidt

ORIENTADOR: Prof. Dr. Ernesto Hashime Kubota

CO-ORIENTADORA: Prof<sup>ª</sup> Dr<sup>ª</sup>. Rosa Cristina Prestes Dornelles

O processo de elaboração da carne mecanicamente separada (CMS) gera de 15% a 45% de resíduo. A obtenção de colágeno e hidrolisados proteicos é uma alternativa promissora para agregar valor a este resíduo. Os métodos de obtenção de colágeno e hidrolisados baseiam-se na hidrólise química ou enzimática, outro método que vem recebendo destaque é o ultrassom, que possibilita a redução do tempo de processo e aumento do rendimento. Diante deste contexto, este trabalho teve por objetivo a obtenção de hidrolisados proteicos e colágeno a partir do resíduo de CMS de frango através de hidrólise enzimática assistida ou não por ultrassom. O colágeno de resíduo de CMS de frango extraído com pepsina exibiu bom rendimento e elevada estabilidade térmica, a estrutura helicoidal tripla estava conservada, o que foi confirmado pelas análises de eletroforese (SDS-PAGE) e espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier (FTIR), sendo o colágeno constituído principalmente por colágeno do tipo I. Quanto a funcionalidade, o colágeno apresentou solubilidade elevada em pH ácido e índice de atividade emulsificante superior a gelatinas convencionais. O pré-tratamento com ultrassom e o tempo de extração enzimática com pepsina apresentaram efeito positivo sobre o rendimento de extração do colágeno sem afetar sua integridade. O colágeno de resíduo de CMS foi hidrolisado com as enzimas Alcalase<sup>®</sup> e Flavourzyme<sup>®</sup>, o maior grau de hidrólise foi obtido com Alcalase<sup>®</sup>. As análises de calorimetria exploratória diferencial (DSC), FTIR e SDS-PAGE confirmaram a hidrólise, que afetou também a funcionalidade do colágeno hidrolisado, que apresentou diminuição da viscosidade e capacidade de formação de espuma e melhora no índice de atividade emulsificante. Diante disso, o resíduo de CMS de frango comprovou ser uma fonte tecnologicamente viável para extração de colágeno e, o colágeno deste resíduo se mostrou promissor como alternativa aos colágenos tradicionais, com potencial de aplicação industrial. A obtenção de hidrolisados a partir de colágeno de resíduo de CMS de frango utilizando Alcalase<sup>®</sup> e Flavourzyme<sup>®</sup> se mostrou viável, com potencial para aplicação futura.

**Palavras-chave:** FTIR; SDS-PAGE; Pepsina; DSC; Ultrassom; Propriedades funcionais.

## ABSTRACT

### **CHICKEN COLLAGEN: AN ALTERNATIVE TO ADD VALUE TO SUBPRODUCTS OF THE POULTRY INDUSTRY**

AUTHOR: Michele Mantelli Schmidt  
SUPERVISOR: Prof. Dr. Ernesto Hashime Kubota  
CO-SUPERVISOR: Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup>. Rosa Cristina Prestes

The process of elaboration of mechanically separated meat (MSM) generates 15% to 45% of residue. Obtaining collagen and protein hydrolysates is a promising alternative to add value to this residue. The methods to obtain the collagen and hydrolysates are based on chemical or enzymatic hydrolysis, another method that has been highlighted is the ultrasound method, which enables process time reduction and increase of yield. In this context, this project aims the obtaining of protein hydrolysates and collagen from residue of MSM of chicken through enzymatic hydrolysis assisted or not by ultrasound. The collagen of MSM residue of chicken extracted with pepsin presented good performance and high thermal stability, the triple helical structure was conserved, which was confirmed by electrophoresis (SDS-PAGE) and Fourier transform infrared (FTIR) analyzes, the collagen being composed mainly by collagen of type I. Concerning to the functionality, the collagen presented acid pH solubility and emulsifying activity index higher than conventional gelatins. Pre-treatment with ultrasound and time of enzymatic extraction with pepsin had a positive effect on the extraction yield of the collagen without affecting its integrity. The MSM residue collagen was hydrolyzed with the enzymes Alcalase<sup>®</sup> and Flavourzyme<sup>®</sup>, the highest degree of hydrolysis was obtained with Alcalase<sup>®</sup>. Differential scanning calorimetry (DSC), FTIR and SDS-PAGE confirmed the hydrolysis, which also affected the functionality of the hydrolyzed collagen, which showed a decrease in viscosity and foaming ability and an improvement in the emulsifying activity index. Thus, the MSM residue of chicken proved to be a technologically source viable for the extraction of collagen and the collagen of this residue was promising as an alternative to traditional collagens with potential for industrial application. Obtaining hydrolysates from collagen of MSM residue of chicken using Alcalase<sup>®</sup> and Flavourzyme<sup>®</sup> proved to be viable, with potential for future application.

**Keywords:** FTIR; SDS-PAGE; Pepsin enzyme; DSC; Ultrasound; Functional properties.

## LISTA DE FIGURAS

### Manuscrito 2

- Figura 1 – a) Espectro de FTIR e b) segunda derivada do espectro do colágeno de resíduo de CMS de frango extraído com pepsina.....100
- Figura 2 – Termograma por DSC para o colágeno de resíduo de CMS de frango extraído com pepsina.....101
- Figura 3 – Eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) do colágeno de resíduo de CMS de frango extraído com pepsina.....101
- Figura 4 – Solubilidade relativa (%) de colágeno de resíduo de CMS de frango extraído com pepsina em função da variação do pH.....102

### Manuscrito 3

- Figura 1 – a) Espectros de FTIR e b) segunda derivada dos espectros dos colágenos de resíduo de CMS de frango extraídos utilizando planejamento fatorial em  $2^2$  com ponto central.....116
- Figura 2 – Gráfico de dispersão 3D obtido pela PCA com base nos principais picos do espectro FTIR dos colágenos de resíduo de CMS de frango.....118
- Figura 3 – Termograma por DSC para os colágenos de resíduo de CMS de frango extraídos utilizando planejamento fatorial em  $2^2$  com ponto central.....120
- Figura 4 – Eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) dos colágenos de resíduo de CMS de frango extraídos utilizando planejamento fatorial em  $2^2$  com ponto central.....121
- Figura 5 – Curvas de solubilidade relativa em função do pH (0 a 10) dos colágenos de resíduo de CMS de frango extraído conforme planejamento fatorial  $2^2$ .....122

### Manuscrito 4

- Figura 1 – Espectros de FTIR do colágeno de resíduo de CMS de frango e dos colágenos hidrolisados com Flavourzyme<sup>®</sup> e Alcalase<sup>®</sup>.....159
- Figura 2 – Termograma por DSC para (a) colágeno de resíduo de CMS de frango, (b) colágeno hidrolisado por Alcalase<sup>®</sup> e (c) colágeno hidrolisado por Flavourzyme<sup>®</sup>.....160
- Figura 3 – Eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) do colágeno de resíduo de CMS de frango, colágeno hidrolisado por Alcalase<sup>®</sup> e colágeno hidrolisado por Flavourzyme<sup>®</sup>.....161

## LISTA DE TABELAS

Quadro 1 – Alguns estudos que mencionaram a extração de colágenos disponíveis na literatura.....20

### Manuscrito 1

Tabela 1 – Some procedures used in the extraction of collagen from animal waste reported in the literature.....62

### Manuscrito 2

Tabela 1 – Resultados obtidos para a composição centesimal do resíduo de CMS de frango e resíduo de CMS de frango pré-tratado em base úmida e base seca.....96

Tabela 2 – Resultados obtidos para a composição centesimal do colágeno de resíduo de CMS de frango extraído com pepsina (g/100g de amostra).....96

Tabela 3 – Composições de aminoácidos do colágeno de resíduo de CMS de frango extraído com pepsina (resíduos/1000 resíduos).....97

Tabela 4 – Principais picos do espectro de infravermelho com transformada de Fourier do colágeno de resíduo de CMS de frango extraído com pepsina.....98

Tabela 5 – Capacidade de formação de espuma (CFE) e estabilidade da espuma (EE) do colágeno de resíduo de CMS de frango extraído com pepsina.....99

Tabela 6 – Viscosidade da solução de colágeno de resíduo de CMS de frango extraído com pepsina.....99

### Manuscrito 3

Tabela 1 – Tratamentos testados com base no planejamento fatorial completo  $2^2$  com ponto central e rendimentos e teor de proteína obtidos para os diferentes tratamentos de extração de colágeno de resíduo de CMS de frango.....114

Tabela 2 – Valores dos efeitos das variáveis estudadas no rendimento em base seca obtido na extração de colágeno de resíduo de CMS de frango.....115

Tabela 3 – Resultados da DSC de desnaturação dos colágenos de resíduo de CMS de frango extraídos utilizando planejamento fatorial em  $2^2$  com ponto central.....119

### Manuscrito 4

Tabela 1 – Viscosidade para o colágeno de resíduo de CMS de frango bruto e hidrolisados obtidos com Alcalase<sup>®</sup> e Flavourzyme<sup>®</sup>, nas temperaturas de 10, 25 e 50 °C.....158

Tabela 2 – Capacidade de formação de espuma (CFE), estabilidade da espuma (EE), índice de atividade emulsificante (EAI) e índice de estabilidade da emulsão (ESI) para o colágeno de resíduo de CMS de frango bruto e hidrolisados obtidos com Alcalase<sup>®</sup> e Flavourzyme<sup>®</sup> .....158



## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ANOVA	Análise de Variância Univariada
BSE	Encefalopatia Espongiforme Bovina
CFE	Capacidade de Formação de Espuma
CMS	Carne Mecanicamente Separada
DSC	Calorimetria Exploratória Diferencial
EAI	Índice de Atividade Emulsionante
EEs	Estabilidade da Espuma
ESI	Índice de Estabilidade da Emulsão
FTIR	Espectroscopia de Infravermelho de Transformada de Fourier
MANOVA	Análise de Variância Multivariada
PCA	Análise de Componentes Principais
pH	Potencial Hidrogeniônico
SDS-PAGE	Análise de Eletroforese em Gel de Poliacrilamida

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO .....</b>	<b>11</b>
1.1. Objetivos .....	12
1.1.1. Objetivo geral .....	12
1.1.2. Objetivos específicos .....	12
<b>2. REVISÃO DA LITERATURA.....</b>	<b>13</b>
2.1. Avicultura e produção de carne mecanicamente separada (CMS).....	13
2.1.1. Resíduo de CMS de aves .....	14
2.2. Colágeno.....	14
2.3. Hidrolisados proteicos.....	15
2.4. Obtenção de colágeno e hidrolisados proteicos .....	16
2.4.1. Uso do ultrassom na obtenção de colágeno .....	22
2.5. Aplicabilidade de hidrolisados proteicos e colágeno .....	23
<b>3. DESENVOLVIMENTO .....</b>	<b>25</b>
3.1. Manuscrito 1.....	25
3.2. Manuscrito 2.....	65
3.3. Manuscrito 3.....	103
3.4. Manuscrito 4.....	129
<b>4. DISCUSSÃO GERAL .....</b>	<b>162</b>
<b>5. SUGESTÕES DE TRABALHOS FUTUROS.....</b>	<b>164</b>
<b>6. CONCLUSÃO .....</b>	<b>164</b>

## 1. INTRODUÇÃO

O Brasil é o segundo maior produtor mundial e o maior exportador de carne de frango. Em 2015 foram produzidas 13,14 milhões de toneladas deste tipo de carne (ABPA, 2016). Segundo Negrão et al. (2005) cerca de 20% da produção de frango são transformadas em carne mecanicamente separada (CMS). A CMS é obtida por processo mecânico de moagem e separação de ossos de animais de açougue e destinada à elaboração de produtos cárneos. O rendimento das máquinas processadoras de CMS varia dependendo do tipo de matéria-prima e o resíduo gerado é da ordem de 15% a 45%.

O resíduo de CMS contém alto teor de proteínas e colágeno o que o torna uma alternativa promissora para obtenção de hidrolisados proteicos e colágeno, permitindo agregar valor a este resíduo. Segundo informações da agroindústria parceira deste projeto, o volume de resíduo de CMS gerado por dia é de cerca de 10 toneladas, como são seis frigoríficos que processam frango o volume total gerado mensalmente é de aproximadamente 1.200 toneladas. Atualmente a empresa destina este resíduo para fabricação de ração com um valor de apenas R\$ 0,30/kg. A obtenção de hidrolisados proteicos e/ou colágeno permitirá agregar valor aos resíduos podendo chegar a um preço de venda final de até R\$ 50,00/kg (valor final para comercialização na forma de colágeno hidrolisado).

Diversos estudos (Li et al., 2013; Zhong-Rui et al., 2013; Kaewdang et al., 2014; Sinthusamran et al., 2014; Wang et al., 2014; Zhang et al., 2014; Nagai, et al., 2015; Zhou et al., 2016) têm abordado a obtenção de hidrolisados proteicos e colágeno de diferentes fontes animais, principalmente de pescados, como alternativa ao colágeno bovino em virtude da Encefalopatia Espongiforme Bovina (BSE) e como alternativa ao colágeno suíno para os países de religião muçulmana, porém, não há estudos sobre colágeno de resíduo de CMS de frango.

O colágeno e os hidrolisados proteicos podem ser obtidos dos subprodutos do abate de animais através da hidrólise química ou enzimática. A hidrólise química é mais comumente utilizada na prática industrial, porém os processos enzimáticos são mais promissores quando se deseja produtos com alta funcionalidade e valor nutritivo (Martins et al., 2009), para isso são utilizadas proteases animais ou vegetais tais como tripsina, quimotripsina, pepsina, pronase, alcalase, colagenases, bromelina e papaína (Webster et al., 1982, Gómez-Guillén et al., 2011, Khan et al., 2011).

O ultrassom é um método que tem sido empregado com sucesso nos processos de obtenção de colágeno e hidrolisados, reduzindo o tempo de processo e aumentando o

rendimento (Hu et al., 2013; Sivakumar & Rao, 2003). No entanto, os estudos sobre o efeito do ultrassom na atividade das enzimas ainda é muito limitado. Além disso, sabe-se que a aplicação do ultrassom durante um longo período de tempo pode quebrar as ligações de hidrogênio e interações nas cadeias de polipeptídeos, levando a desnaturação da proteína/enzima.

Ainda não existe na literatura estudos disponíveis sobre a obtenção e caracterização de colágeno e hidrolisados proteicos de resíduo de CMS de frango. Há poucos estudos mencionando a utilização do ultrassom para obtenção de colágenos visando aumento de rendimento, produção mais limpa, menor tempo de extração e diferenças na funcionalidade dos hidrolisados, o que reforça ainda mais a necessidade de novos estudos, como o proposto neste trabalho.

## **1.1. Objetivos**

### **1.1.1. Objetivo geral**

Obtenção de hidrolisados proteicos e colágeno a partir do resíduo de carne mecanicamente separada (CMS) de frango através de hidrólise enzimática assistida ou não por ultrassom.

### **1.1.2. Objetivos específicos**

- Caracterizar o resíduo gerado na obtenção da carne mecanicamente separada de frango;
- Testar diferentes métodos e processos de extração de colágeno a partir do resíduo de CMS de frango;
- Obter o colágeno por hidrólise enzimática assistida e não assistida por ultrassom;
- Obter hidrolisados proteicos a partir do colágeno de resíduo de CMS de frango;
- Caracterizar os hidrolisados e colágenos obtidos com e sem ultrassom;
- Avaliar as propriedades funcionais dos hidrolisados e colágenos.

## **2. REVISÃO DA LITERATURA**

### **2.1. Avicultura e produção de carne mecanicamente separada (CMS)**

O Brasil é o segundo maior produtor mundial e o maior exportador de carne de frango. Em 2015 foram produzidas 13,14 milhões de toneladas deste tipo de carne (ABPA, 2016). Segundo Negrão et al. (2005) cerca de 20% das carcaças de frango produzidas são transformadas em carne mecanicamente separada (CMS). A CMS é utilizada como matéria-prima para produtos cárneos cozidos tais como mortadelas e salsichas.

Devido às peculiaridades de produção e comercialização do frango no Brasil, caracterizado pelo grande volume de cortes nobres exportados (peito e coxa), os cortes de menor valor ou o que resulta da desossa são destinados à separação mecânica. Devido ao baixo custo, grandes volumes gerados e do aproveitamento da CMS como matéria-prima para produtos cárneos de menor valor e de grande consumo pela população brasileira, a CMS tornou-se uma das mais importantes matérias-primas para a indústria de carnes (Olivo, 2006).

A obtenção de CMS é uma tecnologia de aproveitamento racional de subprodutos comestíveis com objetivo de obter uma matéria-prima de qualidade, funcionalidade e de custo relativamente baixo (Olivo, 2006). As máquinas de separação mecânica de carnes foram desenvolvidas inicialmente no Japão em 1940 com objetivo de aproveitar pescados de menor valor e pelo crescimento na comercialização de produtos em que é permitida a utilização desta carne. Já a separação mecânica da carne de aves começou nos EUA no final de 1950 em decorrência do maior consumo de cortes de frango ao invés de carcaças inteiras e mais tarde em razão da utilização da carne mecanicamente separada em produtos industrializados tais como *nuggets* e salsichas. A CMS surgiu como uma alternativa para o aproveitamento de sobras do processo de desossa manual onde se inclui, por exemplo, o dorso e o pescoço.

Segundo a legislação brasileira a CMS é a carne obtida por processo mecânico de moagem e separação de ossos de animais de açougue e destinada à elaboração de produtos cárneos específicos (MAPA, 2000). A matéria-prima para obtenção da CMS consiste de ossos, carcaças ou parte das carcaças de animais de açougue (aves, bovinos e suínos) que tenham sido aprovados para consumo humano pelo SIF (Serviço de Inspeção Federal) e não podem ser utilizados como matérias-primas os pés, cabeças e patas. A CMS de frango normalmente é obtida industrialmente de carcaças inteiras ou partes de carcaças que já passaram pelo processo de desossa ou ainda cortes e partes com menor valor comercial, tais como pescoço e sambiquira.

As características físico-químicas obrigatórias para a CMS segundo a legislação brasileira (MAPA, 2000) são: mínimo 12% de proteína, máximo 30% de gordura, máximo 1,5% de cálcio em base seca e índice de peróxidos máximo de 1 mEq KOH por kg de gordura.

### **2.1.1. Resíduo de CMS de aves**

As máquinas de separação mecânica de carnes, utilizadas na produção da CMS, apresentam um rendimento que varia de 55% a 85% dependendo do tipo de matéria-prima (osso, pescoço, dorso, asas, frango inteiro e da ausência ou presença da pele) e se são provenientes de peru ou frango. O resíduo do processo de separação é da ordem de 15% a 45%. Além disso, a composição centesimal da CMS vai depender do tipo de equipamento utilizado.

Segundo informações da agroindústria parceira deste projeto, Cooperativa Central Aurora (Aurora Alimentos), o volume de resíduo de CMS gerado por dia é de cerca de 10 toneladas, como são seis frigoríficos que processam frango o volume total gerado mensalmente é de aproximadamente 1.200 toneladas. Atualmente a empresa destina este resíduo para fabricação de ração com um valor de aproximadamente R\$ 0,30/kg.

O resíduo de CMS de frango contém alto teor de proteínas e colágeno, o que o torna uma alternativa promissora para obtenção de colágeno e hidrolisados proteicos, permitindo a agregação de valor a este resíduo, visto que colágenos e hidrolisados possuem elevado valor comercial.

## **2.2. Colágeno**

Colágenos são proteínas fibrosas encontradas em todos os animais multicelulares, sendo um importante componente das estruturas de apoio nos vertebrados e invertebrados. Nos mamíferos é a mais abundante proteína corporal, correspondendo a aproximadamente 25% em massa de todas as proteínas (Ward & Courts, 1977; Damodaran et al., 2010), é a principal proteína constituinte da pele, tendões, cartilagem, ossos e dos tecidos em geral. Em aves e peixes, desempenha um papel semelhante e nos invertebrados é um importante componente da parede corporal (Ward & Courts, 1977).

A molécula de colágeno tem cerca 280 nm de comprimento, com massa molecular de 360.000 Da, é estabilizada por ligações de hidrogênio e por ligações intermoleculares (da Silva & Penna, 2012), sendo composta por três cadeias polipeptídicas helicoidais, cada uma com aproximadamente 1.000 aminoácidos denominada de cadeia  $\alpha$ . As cadeias se enovelam

formando uma tripla hélice estável e de tamanho variado. As moléculas de tripla hélice apresentam domínios globulares terminais, e são denominadas de procolágeno. Estas regiões globulares são clivadas em graus variados para dar origem a uma estrutura polimerizada, o tropocolágeno, que é a unidade básica do colágeno. As moléculas de tropocolágeno são estabilizadas por interações hidrofóbicas e eletrostáticas (Nelson & Cox, 2004; Damodaran et al., 2010).

Existem diferentes tipos de colágenos nos vertebrados, em geral eles contêm cerca de 35% de glicina (Gly), 11% de alanina (Ala) e 21% de prolina (Pro) e hidroxiprolina (Hyp). A sequência de aminoácidos no colágeno é geralmente uma unidade tripeptídica repetitiva, Gly-X-Y, sendo frequentemente X a Pro e Y a Hyp (Nelson & Cox, 2004).

Foram relatados pelo menos 29 tipos diferentes de colágeno, que são classificados de acordo com sua estrutura em: estriado (fibroso), não fibroso (formador de rede), microfibrilar (filamentoso) e associado às fibrilas (Damodaran et al., 2010).

O colágeno do Tipo I é o mais abundante, principalmente no tecido conectivo, tais como pele, tendões e ossos. É composto de três cadeias polipeptídicas, das quais duas são idênticas, denominadas cadeia  $\alpha 1(I)$ , e uma  $\alpha 2(I)$  com a composição de aminoácidos diferente. O colágeno do Tipo II ocorre praticamente exclusivamente em tecido de cartilagem e acredita-se que a subunidade  $\alpha 1(II)$  seja semelhante à  $\alpha 1(I)$ . O colágeno do Tipo III, é fortemente dependente da idade: uma pele muito jovem pode conter até 50%, mas, com decorrer do tempo, pode ser reduzido para 5 a 10%. Os outros tipos de colágeno estão presentes apenas em quantidades muito reduzidas, principalmente em órgãos específicos, como lâminas basais, córnea, músculo do coração, pulmão e mucosa intestinal (Schrieber & Gareis, 2007; Karim & Bhat, 2009).

### **2.3. Hidrolisados proteicos**

Hidrolisados de proteínas são concentrados protéicos, obtidos através da hidrólise enzimática de proteínas nativas em peptídeos menores, que, geralmente, contêm de 2 a 20 aminoácidos (Chalamaiah et al., 2012). A hidrólise proteica pode ser realizada por hidrólise enzimática ou hidrólise química, com ácidos ou alcalis, no entanto a hidrólise enzimática é mais indicada para a produção de hidrolisados com aplicações nutricionais. O uso de enzimas ao invés de reagentes químicos é benéfico, uma vez que permite o controle da hidrólise, melhorando as propriedades do produto final (Schmidt e Salas-Mellado, 2009).

Várias proteases comerciais têm sido usadas para a produção de hidrolisados de proteínas e peptídeos, dentre elas a tripsina, pepsina, flavourzyme, alcalase, protease P,

pronase, collagenase, bromelaína e papaína (Bhaskar et al., 2007; Yang et al., 2008; Schmidt e Salas-Mellado, 2009; Chi et al., 2016; Fu et al., 2016). A especificidade da enzima afeta o tamanho, a quantidade e a composição dos aminoácidos livres e dos peptídeos, que por sua vez influenciam a atividade biológica dos hidrolisados (Gómez-Guillén et al., 2011).

A hidrólise enzimática de proteínas altera o seu tamanho molecular gerando uma mistura de aminoácidos livres, di-, tri- e oligo-peptídeos, aumenta o número de grupos polares, a solubilidade, altera a estrutura e a força de interação intra e intermolecular (dos Santos et al., 2011; Bao et al., 2017). Como as propriedades funcionais das proteínas estão relacionadas à sua estrutura (seqüência e composição de aminoácidos, peso molecular, conformação e carga distribuída na molécula) a funcionalidade é alterada pelo processo de hidrólise, melhorando a qualidade funcional e disponibilidade (dos Santos et al., 2011).

Assim, a hidrólise proteica deve ser cuidadosamente monitorada e controlada para fins de fabricação de produtos com a funcionalidade desejada (Bao et al., 2017).

#### **2.4. Obtenção de colágeno e hidrolisados proteicos**

Em se tratando de colágeno, recentemente houve um crescente interesse pelos processos de extração do colágeno e seus derivados devido à tendência de utilização desta proteína em substituição aos agentes sintéticos nos mais diversos processos industriais e também por permitir uma maior valorização dos subprodutos do abate dos animais. Algumas pesquisas têm abordado a obtenção de colágenos de diferentes fontes animais (principalmente de pescados) como alternativa ao colágeno bovino em virtude da Encefalopatia Espongiforme Bovina (BSE) e como alternativa ao colágeno suíno para os países de religião muçulmana (Kittiphattanabawon et al., 2010; Li et al., 2013; Zhong-Rui et al., 2013; Kaewdang et al., 2014; Sinthusamran et al., 2014; Wang et al., 2014; Zhang et al., 2014).

O colágeno pode ser obtido basicamente por hidrólise química e hidrólise enzimática (Zavareze et al., 2009), a hidrólise química é mais comumente utilizada na prática industrial, porém os processos biológicos que utilizam adição de enzimas são mais promissores quando se deseja produtos com alta funcionalidade e valor nutritivo (Martins et al., 2009). Para a extração do colágeno, é necessário remover numerosas ligações cruzadas covalentes intra e intermoleculares, principalmente envolvendo resíduos de lisina e hidroxilisina, ligações éster e outras ligações com sacarídeos, o que torna o processo bastante complexo (Ran & Wang, 2014).

Antes da extração do colágeno é realizado um pré-tratamento para remoção de substâncias não colagenosas. Os métodos de extração comumente empregados baseiam-se na



solubilidade do colágeno em soluções salinas neutras e soluções ácidas e no uso de enzimas. Muitos estudos têm realizado extrações consecutivas do colágeno, com sal, ácido e enzimas, a fim de determinar o melhor método de extração, para obtenção de maiores rendimentos e colágenos de melhor qualidade (Li et al., 2013; Wang et al., 2014; Nagai et al., 2015).

O método de extração pode influenciar o comprimento das cadeias polipeptídicas e as propriedades funcionais do colágeno, tais como viscosidade, solubilidade, capacidade de retenção de água e emulsificação. Isso varia de acordo com os parâmetros de processamento (enzima, temperatura, tempo e pH), o tratamento prévio e o método de conservação e propriedades da matéria-prima inicial (Karim & Bhat, 2009).

Desta forma é necessário realizar uma hidrólise parcial controlada das ligações cruzadas e ligações peptídicas da estrutura original do colágeno para obter a distribuição de peso molecular ideal para a aplicação prevista (Schrieber & Gareis, 2007). Devido a isso, tem se dado ênfase ao uso de enzimas proteolíticas selecionadas, uma vez que estas permitem o controle do grau de clivagem das proteínas no substrato, além, de a hidrólise enzimática apresentar algumas vantagens sobre a hidrólise química, como a especificidade, o controle do grau de hidrólise, as condições moderadas de ação e o menor conteúdo de sal no hidrolisado final. Ainda, as enzimas podem ser empregadas, geralmente, em concentrações muito baixas, sendo desnecessária sua remoção (Zavareze et al., 2009).

Os hidrolisados proteicos também podem ser obtidos dos subprodutos do abate de animais através da hidrólise enzimática utilizando proteases animais ou vegetais tais como tripsina, quimotripsina, pepsina, pronase, alcalase, colagenases, bromelina e papaína (Webster et al., 1982, Gómez-Guillén et al., 2011, Khan et al., 2011) .

Na literatura a maioria dos hidrolisados proteicos são obtidos comumente da caseína, proteínas do soro do leite e da proteína de soja (Hu et al., 2013). Alguns estudos avaliaram a obtenção de hidrolisados proteicos da própria CMS, porém há uma lacuna na literatura sobre o uso do resíduo de CMS como matéria-prima para obtenção de colágeno e/ou hidrolisados proteicos.

Zhou et al. (2016) extraíram colágeno solúvel em sal (cloreto de sódio), ácido acético e pepsina, a partir de pés de galinha, o rendimento foi de 1,13, 14,49 e 49,10%, respectivamente. Todos os colágenos apresentaram estrutura helicoidal tripla intacta e topografia de superfície similar. O colágeno solúvel em pepsina mostrou maior estabilidade térmica e maior grau de hidrólise em relação aos demais.

O colágeno da pele de peixe Amur sturgeon (*Acipenser schrenckii*) foi isolado e caracterizado por Wang et al. (2014). Foi realizada extração em solução salina, seguida de

extração em ácido acético e posteriormente extração com pepsina, os rendimentos foram 4,55%, 37,42% e 52,80%, respectivamente. Todos os colágenos isolados mantiveram a estrutura de tripla hélice e eram compostos principalmente por colágeno tipo I, com morfologia e perfil de aminoácidos semelhantes. A análise de FTIR indicou mais ligações de hidrogênio no colágeno solúvel em pepsina e mais ligações cruzadas intermoleculares no colágeno solúvel em ácido. Os diferentes colágenos também apresentaram algumas diferenças na estabilidade térmica, que poderia ser atribuído ao nível de hidratação, o número e natureza das ligações cruzadas covalentes.

Moraes & Cunha (2013) avaliaram as propriedades gelificantes e capacidade de retenção de água (CRA) do colágeno da camada interna da pele bovina hidrolisado em diferentes condições de temperatura (50, 60 e 80 °C) e pH (3, 5, 7 e 10). Os teores mais elevados de proteínas solúveis foram obtidos a partir dos tratamentos realizados em 80 °C e pH abaixo do ponto isoelétrico. Os produtos obtidos em condições extremas de pH (3 e 10) ou em altas temperaturas (80 e 60 °C) foram completamente desnaturados. Em geral, os hidrolisados obtidos com pH ácido, formaram géis mais firmes, exceto quando produzidos em condições mais intensas de tratamento térmico. A CRA dos géis foi de aproximadamente 100%, exceto para os hidrolisados obtidos em pH elevado (7 e 10) e acima da temperatura de desnaturação (80 °C).

A influência da concentração de substrato (3,3 a 11,7%), concentração de enzima Alcalase<sup>®</sup> e Flavourzyme<sup>®</sup> (2,9 a 9,1%) e o tempo de hidrólise (39,6 a 140,4 minutos) no grau de hidrólise das proteínas de peito e coxa de frango foram testadas por Schmidt & Salas-Mellado (2009). Os valores de grau de hidrólise obtidos com a enzima Alcalase<sup>®</sup> foram superiores aos da enzima Flavourzyme<sup>®</sup>. Foi observado um efeito negativo da concentração de substrato e um efeito positivo da concentração de enzima e do tempo no grau de hidrólise das proteínas.

Kittiphattanabown et al. (2010) extraíram colágeno de cartilagens de tubarão (*Chiloscyllium punctatum* e *Carcharhinus limbatus*). A extração foi realizada inicialmente com ácido acético e, posteriormente o resíduo foi extraído com pepsina. O colágeno extraído por pepsina apresentou rendimento muito superior ao colágeno extraído com ácido, além disso, os espectros de ambos os colágenos obtidos por FTIR foram bastante semelhantes, sugerindo que a hidrólise com pepsina não afeta a estrutura secundária de colágeno, especialmente a estrutura tripla hélice.

No **Quadro 1** podem ser visualizados de forma resumida alguns estudos que avaliaram a obtenção de colágeno de matérias-primas alternativas, pré-tratamento, procedimento de extração e metodologias de caracterização empregadas.

**Quadro 1** – Alguns estudos que mencionaram a extração de colágenos disponíveis na literatura.

<b>Matéria-Prima</b>	<b>Pré-tratamento</b>	<b>Procedimento de extração</b>	<b>Caracterização</b>	<b>Referência</b>
<p>Pele de Ema (<i>Dromaius novaehollandiae</i>)</p>	<p>Homogeneização com etanol 10% por 4 dias. Extração com NaOH 0,1M por 2 dias. Lavagem com água destilada por 2 dias. Liofilização.</p>	<p>Extrações consecutivas com ácido acético 0,5 M por 48 h, NaCl 0,9 M em ácido acético 0,5 M e pepsina (10%) em ácido acético 0,5 M, por 4 dias.</p>	<p>Eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE). Fracionamento em coluna cromatográfica. Calorimetria exploratória diferencial (DSC). Espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier (FTIR).</p>	<p>Nagai <i>et al.</i> (2015)</p>
<p>Pele de Amur esturjão (<i>Acipenser schrenckii</i>)</p>	<p>Homogeneização com NaCl 20%, por 3 vezes a 4 °C.</p>	<p>Extração com NaCl 0,45 M 1:100 (p/v) durante 24 h. Seguida por extração com ácido acético 0,5 M por 2 vezes de 24 h. Após extração com pepsina (0,1%) em HCl 0,01 M durante 48h. Todas as operações a 4 °C.</p>	<p>Microscopia eletrônica de varredura. DSC Dicroísmo circular (CD). Perfil de aminoácidos. SDS-PAGE FTIR</p>	<p>Wang <i>et al.</i> (2014)</p>
<p>Cartilagens de tubarão (<i>Chiloscyllium punctatum</i> e <i>Carcharhinus limbatus</i>)</p>	<p>Desengorduramento com NaOH 0,1 M, 1:10 (p/v), por 6 h e descalcificação EDTA 0,5 M, 1:10 (p/v), por 40 h, ambos a 4 °C.</p>	<p>Hidrólise ácida com ácido acético 0,5 M, 1:15 (p/v), por 48 h, seguida de hidrólise enzimática, com pepsina porcina (40 unidades/g de resíduo) em ácido acético 0,5 M 1:15 (p/v) por 48 h, ambas a 4 °C.</p>	<p>SDS-PAGE Fracionamento em coluna cromatográfica. Mapeamento de peptídeos. DSC Potencial Zeta. FTIR</p>	<p>Kittiphattanabawon <i>et al.</i> (2010)</p>
<p>Tendão de Aquiles bovino</p>	<p>Lavagem com NaCl 0,15 M e acetona.</p>	<p>Hidrólise com pepsina em ácido acético 0,5 M, por 2 dias a 20 °C. Com e sem o emprego de ultrassom (40 kHz, 120 W, pulsado 30/30 minutos).</p>	<p>CD Microscópio de força atômica (AFM). FTIR</p>	<p>Li <i>et al.</i> (2009)</p>

Bexiga natatória de atum albacora ( <i>Thunnus albacares</i> )	Extração com NaOH 0,15 M 1:10 (p/v), por 2 h a 4 °C e álcool butílico 10%, 1:10 (p/v), por 12 h.	Extração com ácido acético 0,5 M, 1:10 (p/v), durante 48 h a 4 °C. Hidrólise com extrato de estômago de atum albacora (20 unidades/g de bexiga natatória) em ácido acético 0,5 M 1:10 (p/v), por 48 h a 4 °C.	SDS-PAGE FTIR DSC Solubilidade. Potencial Zeta.	Kaewdang <i>et al.</i> (2014)
Pericárdio bovino	Imersão em NaOH 0,1 M, por 48 h a 4 °C.	Extração com pepsina em ácido clorídrico 10 mM, 1:20 (p/v), durante 12 h a 4 °C.	SDS-PAGE Determinação do peso molecular e concentração de proteínas. Microscopia eletrônica de varredura. FTIR	Santos <i>et al.</i> (2013)
Pele e ossos de cavala ( <i>Scomberomorus niphonius</i> )	Pele: Desengorduramento com NaOH 0,1 M, 1:10 (p/v), por 2 dias a 4 °C. Extração com álcool butílico 10% durante 2 dias. Ossos: Extração com NaOH 0,1 M, 1:20 (p/v), durante 48 h. Descalcificação com EDTA-2Na 0,5 M por 5 dias. Extração com álcool butílico 10% por 2 dias.	Pele: Extração com ácido acético 0,5 M, 1:15 (p/v), durante 24h, seguida de extração com pepsina (750 U/mg) em ácido acético 0,5 M, 1:15 (p/v), a 4 °C durante 2 dias. Ossos: Extração com ácido acético 0,5 M, 1:15 (p/v), por 3 dias. Com posterior extração com pepsina (20 U/g de resíduo) em ácido acético 0,5 M, a 4 °C por 2 dias.	Teor de hidroxiprolina. Perfil de aminoácidos. SDS-PAGE FTIR Viscosidade da solução de colágeno. Solubilidade. Mapeamento de peptídeos. Ultraestrutura do colágeno.	Li <i>et al.</i> (2013)

### **2.4.1. Uso do ultrassom na obtenção de colágeno**

O ultrassom é amplamente utilizado para melhorar a transferência de massa em processos por via úmida que são de importância na mistura, extração e secagem (Li et al., 2009; Sivakumar et al., 2010). Na extração do colágeno o ultrassom tem sido empregado com sucesso, reduzindo o tempo de processo e aumentando o rendimento (Sivakumar & Rao, 2003; Hu et al., 2013).

O ultrassom é um processo que utiliza a energia de ondas sonoras geradas em frequência superior à capacidade auditiva do ser humano (maior que 16 kHz) (Chemat & Khan, 2011). Os efeitos do ultrassom em sistemas líquidos são principalmente devido ao fenômeno da cavitação (Hu et al., 2013), durante a sonicação bolhas de cavitação são rapidamente formadas, e sofrem um violento colapso, acarretando em temperaturas e pressões extremas. Isto leva a cisalhamento e turbulência na zona de cavitação (Chemat & Khan, 2011).

Em estudo de Kim et al. (2012), a extração de colágeno de pele de robalo teve seu rendimento aumentado e tempo de extração reduzido após o tratamento ultrassônico, com frequência de 20 kHz, em ácido acético 0,5 M. A extração com ultrassom não alterou os principais componentes do colágeno.

Ran & Wang (2014) compararam a extração de colágeno de tendão bovino empregando o ultrassom (20 kHz, pulsado 20/20 segundos) com a extração convencional, realizada com pepsina por 48 h. Variaram-se os tempos de extração com ultrassom (3 a 24 h) e pepsina (24 a 45 h). A combinação de ultrassom com pepsina resultou numa maior eficiência de extração, 6,2% de rendimento, enquanto a extração convencional foi 2,4%. O tempo adequado de extração ultrassônica foi de 18 h. O colágeno extraído apresentou uma estrutura helicoidal ininterrupta, além de boa solubilidade e elevada estabilidade térmica. O uso do ultrassom não causou danos a qualidade do colágeno extraído.

Em estudo de Zou et al. (2017) o uso do ultrassom (potência 200W e frequência de 24 kHz, por 24 minutos) elevou em 16,3% o rendimento do colágeno de soft-shelled turtle calipash solúvel em ácido e não interrompeu a estrutura helicoidal do colágeno. Além disso, o colágeno extraído com ultrassom apresentou maior estabilidade térmica e propriedades funcionais superiores.

Li et al. (2009) utilizaram o ultrassom (40 kHz, 120 W) na extração de colágeno de tendão bovino. Os resultados mostraram que o ultrassom aumentou em até 124% o rendimento de extração e reduziu o tempo de processo. Estes resultados foram justificados

pelo aumento da atividade e dissolução do substrato, uma vez que o ultrassom permite uma maior dispersão da pepsina e abertura das fibrilas de colágeno facilitando a ação da enzima.

No entanto, os estudos sobre o efeito do ultrassom na atividade da enzima ainda é muito limitado (Li et al. 2009). A aplicação do ultrassom durante um longo período de tempo, devido a cavitação, pode dar origem a temperaturas e força de cisalhamento elevadas e altas pressões no interior do meio. Também poderia quebrar as ligações de hidrogênio e interações de van der Waals nas cadeias de polipeptídeos, levando a desnaturação da proteína/enzima (Ran & Wang, 2014).

## **2.5. Aplicabilidade de hidrolisados proteicos e colágeno**

O colágeno apresenta diversas aplicações na indústria farmacêutica, cosmética, e fotográfica e na área de alimentos, recentemente, aumentaram as aplicações de colágeno como emulsificante, agente de liga, estabilizante, encapsulamento de micro-organismos e formação de biofilmes (Kim & Mendis, 2006; Gómez-Guillén et al., 2011).

Na indústria de alimentos clássica, o uso da gelatina é baseado, principalmente, em suas propriedades de formação visco-elásticas e de gel. Recentemente, novas aplicações têm sido encontradas em produtos emulsionados, como agente espumante, material para embalagens biodegradáveis e como agente de encapsulamento, nestes últimos, visando a substituição de materiais sintéticos por materiais naturais (Gómez-Guillén et al., 2011). Por ser uma proteína, a gelatina possui baixo teor de calorias, e como possui a propriedade de derreter na boca, pode ser utilizada como substituto de gordura em alimentos com baixo teor desta (Karim & Bhat, 2009).

A introdução do colágeno nas formulações de produtos cárneos, além de melhorar a elasticidade, a consistência e a estabilidade, caracteriza-se como uma alternativa para o incremento no consumo de colágeno pelo consumidor, podendo a indústria desenvolver e ofertar produtos funcionais (Prestes, 2013).

Os hidrolisados proteicos constituem uma alternativa promissora para obtenção de proteínas e aminoácidos, podendo ser empregado na formulação de produtos geriátricos e suplementos alimentares com alto teor proteico.

A obtenção de peptídeos biologicamente ativos é outra forma de uso para o colágeno e a gelatina das mais diversas fontes. Estes peptídeos caracterizam-se por apresentarem vários benefícios à saúde, devido a sua atividade antimicrobiana, antioxidante e anti-hipertensiva (Kim et al., 2001; Li et al., 2007; Bernardini et al., 2012; Lin et al., 2012), podendo ser aplicados em formulações nutricionais e farmacêuticas (Gómez-Guillén et al., 2011).





### **3. DESENVOLVIMENTO**

#### **3.1. Manuscrito 1**

##### **COLLAGEN EXTRACTION PROCESS (Mini Review)**

**Artigo publicado na Revista International Food Research Journal (IFRJ)**

**23(3): 913-922 (2016) (Anexo 1)**

(Formatado conforme as normas da revista)

## Collagen extraction process

<sup>1</sup>Schmidt M. M., <sup>1\*</sup>Dornelles R. C. P., <sup>1</sup>Mello R. O., <sup>1</sup>Kubota E. H.,

<sup>2</sup>Mazutti M. A., <sup>3</sup>Kempka A. P. and <sup>4</sup>Demiante I. M.

<sup>1</sup> Department of Technology and Food Science, Federal University of Santa Maria, Santa Maria, RS, Brazil.

<sup>2</sup> Department of Chemical Engineering, Federal University of Santa Maria, Santa Maria, RS, Brazil.

<sup>3</sup> Department of Food Engineering, State University of Santa Catarina (UDESC), Pinhalzinho, SC, Brazil.

<sup>4</sup> State University of Ponta Grossa (UEPG), Graduate Program in Food Science and Technology (PPGCTA), Ponta Grossa, PR, Brazil.

\*Corresponding author: Rosa Cristina Prestes Dornelles, Federal University of Santa Maria, Department of Technology and Food Science, Avenida Roraima, 1000, 97105-900, Santa Maria, Rio Grande do Sul, Brazil, Tel: +55 55 32208254.

E-mail: [rosacrisprestes@hotmail.com](mailto:rosacrisprestes@hotmail.com)

## **Abstract**

Collagen is a fibrous protein which is dominant in the connective tissue of animals; it has a wide range of applications in the food, pharmaceutical, cosmetic and photographic industries, among others. There is a growing interest in the extraction process of collagen and its derivatives due to the growing tendency to use this protein to replace synthetic agents in various industrial processes, which results in a greater appreciation of the by-products from animal slaughter. Collagen's characteristics depend on the raw material and the extraction conditions, which subsequently determine its application. The most commonly used extraction methods are based on the solubility of collagen in neutral saline solutions, acid solutions, and acid solutions with added enzymes. Recently, the use of ultrasound, combined with these traditional processes, has proven effective in increasing the extraction yield. The objective of this review is to address the different collagen extraction processes, from raw materials to the use of combinations of chemical and enzymatic processes, as well as the use of ultrasound. The information outlined in this article have been collected from different national and international journals in Agricultural Sciences e Science and Food Technology, using four bibliographic databases and also some books of renowned authors. Were selected articles published between 2000

and 2015, to address the different collagen extraction processes have been studied.

**Keywords:** hydrolysis; proteases; ultrasound; by-products.

## **Introduction**

Collagen is the dominant protein in connective tissue, and it is found in various forms in tissues of all species of multicellular organisms; it exercises various functions, depending on its location (Shimokomaki *et al.*, 2006; Damoradan *et al.*, 2010). It can be extracted from various animal species and it is generally derived from slaughter by-products. The main sources of collagen are the skin, tendons, cartilage and bones. Some studies have addressed ways of obtaining collagen from different animal sources, such as fish and birds, as alternatives to bovine collagen because of the risk of bovine spongiform encephalopathy (Kawwdang *et al.*, 2014; Wang *et al.*, 2014), and also as an alternative to collagen derived from pigs for use in Muslim countries.

There is growing interest in the processes used to extract collagen and its derivatives due to the growing tendency to use this protein in place of synthetic agents in various industrial processes,

and also to provide a greater appreciation of the by-products of animal slaughter (Karim and Bhat, 2008; Gómez-Guillén *et al.*, 2011).

The distribution of molar mass, structure and composition, and the subsequent functional features and properties of collagen, depend on the processing conditions of the raw materials from which it is derived and the specificity of the enzyme used in the extraction process (Prestes, 2013). Thus, it is necessary to determine the appropriate extraction process for each raw material in order to obtain the best performance and the best collagen characteristics for the desired application.

Collagen is considered to be one of the most useful biomaterials because it has a wide range of industrial applications (Lafarga and Hayes, 2014). There is great demand in the food industry for collagen and gelatin because of their high protein content and their functional properties, such as water absorption capacity, gel formation, and the ability to form and stabilize emulsions. In the biomedical and pharmaceutical fields, collagen has several applications; it is used as a vehicle for drugs, proteins and genes, as well as a substitute for human skin, blood vessels and ligaments (Kim and Mendis, 2006; Gómez-Guillén *et al.*, 2011). Several studies have examined collagen in order to obtain bioactive compounds with antimicrobial, antioxidant and anti-hypertensive properties (Saiga *et*

*al.*, 2008; Jia *et al.*, 2009; Wang *et al.*, 2010; Ding *et al.*, 2011; Gómez-Guillén *et al.*, 2011; Bernardini *et al.*, 2012; Barzideh *et al.*, 2014; Abedin *et al.*, 2015).

The objective of this review is to address the different collagen extraction processes, from raw materials to the use of combinations of chemical and enzymatic processes, as well as the use of ultrasound. The information outlined in this article have been collected from different national and international journals in Agricultural Sciences e Science and Food Technology, using four bibliographic databases and also some books of renowned authors. Were selected articles published between 2000 and 2015, to address the different collagen extraction processes have been studied.

#### *Raw materials for collagen extraction*

Meat is the main product derived from the slaughter of animals, while all other entrails and offal are classed as by-products (Bhaskar *et al.*, 2007), including bones, tendons, skin, fatty tissues, horns, hooves, feet, blood and internal organs. The yield of by-products that is generated depends, among other factors, on the species, sex, age and body weight of the animal. The yield varies from 10% - 30% in cattle, pigs and sheep and from 5% - 6% in

poultry (Nollet and Toldrá, 2011). According to Bhaskar *et al.* (2007) about 40% of these by-products are edible and 20% are inedible.

Depending on the culture and the country, edible by-products can be considered as waste or as delicacies that command high prices (Toldrá *et al.*, 2012). However, the majority of by-products are not suitable for human consumption due to their characteristics. As a result, a potential source of income is lost, and the cost of disposal of these products has become increasingly high (Jayathilakan *et al.*, 2012). Nevertheless, there is a growing awareness that these by-products can represent valuable resources if they are used properly.

Generally, inedible by-products are used in the manufacture of fertilizers, animal feed and fuel but there is also a growing market in using them to obtain minerals, fatty acids, and vitamins and to obtain protein hydrolysates and collagen. Obtaining those products, which have high added value, is a better alternative to use these by-products, which would otherwise be discarded.

The main sources for collagen extraction are by-products from the slaughter of pork and beef (Jia *et al.*, 2010; Silva and Penna, 2012). Several of these by-products have been studied, including the Achilles tendon (Li *et al.*, 2009), pericardium (Santos *et al.*, 2013), bovine inner layer of skin (Moraes and Cunha, 2013) and bovine

bones (Paschalis *et al.*, 2001), porcine skin (Yang and Shu, 2014) and porcine lung (Lin *et al.*, 2011).

Recent research has examined alternative sources for the extraction of collagen, with particular emphasis on fish by-products (Muralidharan *et al.*, 2013; Kaewdang *et al.*, 2014; Ninan *et al.*, 2014; Wang *et al.*, 2014; Mahboob, 2015; Tang *et al.*, 2015). This is mainly due to religious restrictions, regarding the non-consumption of pork by Muslims and Jews, and also the risk of bovine spongiform encephalopathy (BSE) (Kaewdang *et al.*, 2014). The latter belongs to a family of diseases known as transmissible spongiform encephalopathies, which are caused by the accumulation of the pathological prion protein (PrP<sup>Sc</sup>) in the brain and central nervous system, which affects adult bovines (Callado and Teixeira, 1998; Toldrá *et al.*, 2012).

The extraction of collagen from fish has been carried out in several species using different by-products, such as Japanese sea bass skin (*Lateolabrax japonicus*) (Kim *et al.*, 2012), skin of clown featherback (*Chitala ornata*) (Kittiphattanabawon *et al.*, 2015), bladder of yellow fin tuna (*Thunnus albacares*) (Kaewdang *et al.*, 2014), skin and bone from Japanese seerfish (*Scomberomorus niphonius*) (Li *et al.*, 2013), cartilage from Japanese sturgeon (*Acipenser schrenckii*) (Liang *et al.*, 2014), and the fins, scales, skins,



bones and swim bladders from bighead carp (*Hypophthalmichthys nobilis*) (Liu *et al.*, 2012). Despite the extraction of marine collagen is easy and safe this collagen presents some limitations in their application, due to its low denaturation temperature (Subhan *et al.*, 2015).

The extraction of collagen from poultry slaughter waste has also been researched, but with less emphasis because of the risk of the transmission of avian influenza (Saito *et al.*, 2009). Studies have been performed regarding emu skin (*Dromaius novaehollandiae*) (Nagai *et al.*, 2015), and chicken feet (Saiga *et al.*, 2008; Almeida *et al.*, 2012a; Hashim *et al.*, 2014), chicken sternal cartilage (Cao and Xu, 2008), chicken skin (Cliche *et al.*, 2003; Munasinghe *et al.*, 2015) and chicken tarsus (Almeida *et al.*, 2012b) etc.

The processing of by-products can convert a product with low value, or one that requires costly disposal, into a product that is able to cover all the costs of processing and disposal, with consequent higher added value and reduced environmental damage (Toldrá *et al.*, 2012).

### *Collagen*

Collagen is a fibrous protein found in all multicellular animals (Voet *et al.*, 2006). It is an important component in the support

structures in vertebrates and invertebrates. It is the most abundant protein in mammals, corresponding to approximately 25% of the weight of all proteins (Ward and Courts, 1977; Voet *et al.*, 2006), and is the major constituent protein of skin, tendons, cartilage, bones and tissues in general. In poultry and fish it plays a similar role to that of invertebrates and is an important component of the body wall (Ward and Courts, 1977).

Collagen molecules are about 280 nm long, with a molar mass of 360,000 Da; they are stabilized by hydrogen bonds and intermolecular bonds (Silva and Penna, 2012), which are composed of three helical polypeptide chains, each with about 1000 amino acids, which are called an  $\alpha$  chain. The chains become entangled, forming a stable triple helix which is varied in size. The triple helix molecules have terminal globular domains and are called procollagen. These globular regions are cleaved in varying degrees to give a polymerized structure (tropocollagen), which is the basic unit of collagen. The tropocollagen molecules are stabilized by hydrophobic and electrostatic interactions (Nelson and Cox, 2004; Damoradan *et al.*, 2010).

There are different kinds of collagen in vertebrates; they typically contain about 35% glycine (Gly), 11% alanine (Ala) and 21% proline (Pro) and hydroxyproline (Hyp). The amino acid sequence in

collagen is generally a repetitive tripeptide unit (Gly-X-Y), where X is frequently Pro and Y is Hyp (Nelson and Cox, 2004).

At least 29 different types of collagen have been reported, which are classified according to their structure into: striatum (fibrous), non-fibrous (network forming), microfibrillar (filamentous) and those which are associated with fibril (Damoradan *et al.*, 2010).

Type I collagen is the most common, primarily in connective tissue, in tissues such as skin, tendons and bones. It consists of three polypeptide chains, two of which are identical, which are called chain  $\alpha 1$  (I) and  $\alpha 2$  (I), and which are composed of different amino acids.

Type II collagen occurs almost exclusively in cartilage tissue and it is believed that the  $\alpha 1$  (II) subunit is similar to the  $\alpha 1$  (I) subunit. Type III collagen is strongly dependent on age: very young skin can contain up to 50%, but with the passage of time that percentage can be reduced to 5-10%. Other types of collagen are only present in very small quantities, mainly in specific organs such as the basement membranes, cornea, heart muscle, lungs and intestinal mucosa (Schrieber and Gareis, 2007; Karim and Bhat, 2009).

#### *Collagen extraction process*

Collagen can be basically obtained by chemical hydrolysis and enzymatic hydrolysis (Zavareze *et al.*, 2009). Chemical hydrolysis is

more commonly used in industry, but biological processes that use the addition of enzymes are more promising when products with high nutritional value and improved functionality are required (Martins *et al.*, 2009). Moreover, enzymatic processes generate less waste and may reduce the processing time, but they are more expensive. To extract collagen it is necessary to remove numerous covalent intra- and intermolecular cross-links, which primarily involves residues of lysine and hydroxy-lysine, ester bonds and other bonds with saccharides, all of which makes the process quite complex (Ran and Wang, 2014).

Before the collagen can be extracted a pre-treatment is performed using an acid or alkaline process, which varies according to the origin of the raw material. The pre-treatment is used to remove non-collagenous substances and to obtain higher yields in the process.

The most commonly used extraction methods are based on the solubility of collagen in neutral saline solutions, acidic solutions, and acidic solutions with added enzymes. Table 1 presents a summary of the procedures employed in the extraction of collagen from animal by-products.

### *Pre-treatment*

Due to the nature of the cross-linked collagen that is present in the connective tissue of animals, it dissolves very slowly, even in boiling water. As a result, a mild chemical treatment is necessary to break these cross-links before extraction (Schreiber and Gareis, 2007). To this end, diluted acids and bases are employed, and the collagen is subjected to partial hydrolysis, which maintains the collagen chains intact but the cross-links are cleaved (Prestes, 2013).

In the acidic form of pre-treatment the raw material is immersed in acidic solution until the solution penetrates throughout the material. As the solution penetrates the structure of the skin at a controlled temperature it swells to two or three times its initial volume and the cleavage of the non-covalent inter- and intra-molecular bonds occurs (Ledward, 2000). The acidic process is more suitable for more fragile raw materials with less intertwined collagen fibers, such as porcine and fish skins (Almeida, 2012b).

The alkaline process consists of treating the raw material with a basic solution, typically sodium hydroxide (NaOH), for a period that can take from a few days to several weeks (Prestes, 2013). This process is used for thicker materials that require a more aggressive penetration by the treatment agents, such as bovine ossein or shavings (Ledward, 2000). NaOH and Ca (OH)<sub>2</sub> are often used for

pre-treatment, but NaOH is better for pre-treating skins because it causes significant swelling, which facilitates the extraction of collagen by increasing the transfer rate of the mass in the tissue matrix (Liu *et al.*, 2015).

A study by Liu *et al.* (2015) evaluated the effect of alkaline pre-treatment on the extraction of acid soluble collagen (ASC) from the skin of grass carp (*Ctenopharyngodon idella*). Concentrations of NaOH from 0.05 to 0.1 M were effective in removing non-collagenous proteins without losing the ASC and structural modifications at temperatures of 4, 10, 15 and 20°C. However, 0.2 and 0.5 NaOH M caused a significant loss of ASC, and 0.5 M NaOH resulted in structural modification in the collagen at 15 and 20°C. In addition to the use of acids and bases, enzymes or chemicals may also be used to cleave the cross-linked bonds to obtain products with different characteristics (Schrieber and Gareis, 2007).

### *Chemical hydrolysis*

In the extraction of collagen which is soluble in salt, neutral saline solutions are used, such as sodium chloride (NaCl), Tris-HCl (Tris (hydroxymethyl) aminomethane hydrochloride), phosphates or citrates. Caution is required in this process in order to control the concentration of salt, but considering that the majority of collagen

molecules are cross-linked, the use of this method is limited (Yang and Shu, 2014).

Acid hydrolysis can be performed by using organic acids such as acetic acid, citric acid and lactic acid, and inorganic acids such as hydrochloric acid. However, organic acids are more efficient than inorganic acids (Skierka and Sadowska, 2007; Wang *et al.*, 2008). Organic acids are capable of solubilizing non-crosslinked collagens and also of breaking some of the inter-strand cross-links in collagen, which leads to a higher solubility of collagen during the extraction process (Liu *et al.*, 2015). Therefore, acidic solutions, especially acetic acid, are commonly used to extract collagen.

For the extraction of acid-soluble collagen, the pre-treated material is added to the acid solution, usually 0.5 M acetic acid, and maintained for 24 to 72 hours under constant stirring at 4°C, depending on the raw material (Wang *et al.*, 2014; Nagai *et al.*, 2015; Kaewdang *et al.*, 2014).

After the extraction stage, a filtering is performed to separate the supernatant (residue) from the collagen, which is in the liquid phase. To obtain collagen powder, the filtrate is usually subjected to precipitation with NaCl. The precipitate is then collected by centrifugation and subsequently re-dissolved in a minimum volume of 0.5 M acetic acid and then dialyzed in 0.1 acetic acid for 2 days, and

distilled water for 2 days, with replacement of the solution on average every 12 hours.

Moraes and Cunha (2013) analyzed collagen from the inner layer of bovine hide that was extracted under different temperature conditions (50, 60 or 80°C) and pH (3, 5, 7 or 10) under stirring for 6 hours. The hydrolysates that were produced in different conditions showed distinct properties. The highest levels of soluble proteins were obtained from treatments at a temperature of 80°C and a pH below the isoelectric point. The products obtained in conditions of extreme pH (3 and 10) or high temperatures (60 and 80°C) were completely denatured. The extractions with acidic pH and high temperature produced collagen with reduced molar mass. In general, the hydrolysates obtained with acidic pH formed firmer gels. The water retention capacity of the gels was approximately 100%, except for the hydrolysates that were obtained at high pH (7 and 10) and above the denaturation temperature (80°C).

Wang *et al.* (2008) optimized the conditions for extraction of acid-soluble collagen in skin from grass carp (*Ctenopharyngodon idella*), having evaluated the effects of the concentration of acetic acid (0.3, 0.5 and 0.8 M), temperature (10, 20 and 30°C) and extraction time (12, 24 and 36 hours). The three tested variables showed a significant effect on collagen extraction and a positive



relationship was found between time and the collagen yield. Increased temperature and concentration of acetic acid increased the yield to a certain value, which then decreased. The optimal conditions to obtain the highest yield of acid-soluble collagen in skin from grass carp were: an acetic acid concentration of 0.54 M at a temperature of 24.7°C for 32.1 hours.

Acid-soluble collagen from the skin and swim bladder of barramundi (*Lates calcarifer*) was extracted by Sinthusamran *et al.* (2013). The pre-treated raw materials were extracted with 0.5 M acetic acid for 48 hours at 4°C. The acid-soluble collagen from the swim bladder showed a higher yield (28.5%) compared to that which was obtained from the skin (15.8%). In both cases the collagen was identified as type I, with some differences in the primary structure. Both the skin and the swim bladder of barramundi showed potential for collagen extraction.

A study by Liu *et al.* (2015) suggested that alkaline pre-treatment and extraction with acetic acid for grass carp (*Ctenopharyngodon idella*) can be performed at a temperature range of 4 to 20°C instead of the commonly used low temperature of 4°C. In this case, there was no significant loss of collagen and structural integrity was maintained, which represents greater convenience in terms of practical and industrial applications.

In general, chemical hydrolysis processes seek optimum conditions for obtaining higher yields by controlling process variables such as concentration, pH, temperature, and process time.

### *Enzymatic hydrolysis*

For the extraction of collagen by enzymatic hydrolysis, the raw material, which can be the residue of acidic extraction, is added to 0.5 M acetic acid solution containing selected enzymes such as pepsin, Alcalase<sup>®</sup> and Flavourzyme<sup>®</sup> (Novozymes<sup>®</sup>, Araucária PR, Brazil). The mixture is continuously stirred for about 48 hours at 4°C followed by filtration (Li *et al.*, 2009; Li *et al.*, 2013; Wang *et al.*, 2014). The filtrate is subjected to precipitation and dialysis under the same conditions as for obtaining acid-soluble collagen.

Woo *et al.* (2008) optimized the extraction of collagen from the skin of yellowfin tuna (*Thunnus albacares*). Pre-treatment was performed with NaOH (0.5 to 1.3 N) at 9°C for 12 to 36 hours for the removal of non-collagenous protein. Subsequently, digestion with pepsin (0.6 to 1.4% (w/v) was performed in hydrochloric acid (HCl) solution (pH 2.0) at 9°C for 12 to 36 hours. The optimal extraction conditions were obtained with a pre-treatment of 0.92 N NaOH for 24 hours and digestion with pepsin at a concentration of 0.98% (w/v) for 23.5 hours.

Wang *et al.* (2014) isolated and characterized collagen from the skin of Japanese sturgeon (*Acipenser schrenckii*) using NaCl, acetic acid and pepsin for extraction. Initially, the skin was pre-treated with NaCl and Tris-HCl and then the saline-soluble collagen was extracted (SSC) in 0.45 M NaCl at pH 7.5 for 24 h with continuous stirring; this was performed six times. After the extraction with salt, the residue was suspended in 0.5 M acetic acid for the extraction of acid-soluble collagen (ASC); the procedure was carried out for 24 hours, twice. The material that was insoluble in acetic acid was used to extract pepsin-solubilized collagen (PSC) by using 0.1% (w/v) pepsin in 0.01 M HCl for 48 hours. The yields of SSC, ASC and PSC were 4.55%, 37.42% and 52.80%, respectively. All the isolated collagens maintained a triple helix structure and were mainly type 1 collagen, with similar morphology and amino acid profiles. The spectroscopic analysis in the mid-infrared region using Fourier transform spectroscopy (FTIR) showed more hydrogen bonds in the PSC and more intermolecular cross-linking in the ASC. The different collagens also showed some differences in terms of thermal stability, which could have been due to the hydration level, as well as the number and type of covalent cross-links.

Kittiphattanabawon *et al.* (2010) extracted collagen from the cartilage of brownbanded shark (*Chiloscyllium punctatum*) and

blacktip shark (*Carcharhinus limbatus*). Pre-treatment was performed using NaOH and ethylenediamine tetraacetic acid (EDTA). The extraction was initially performed with acetic acid for 48 hours at 4°C. Thereafter, the residue that was not dissolved by the acidic extraction was extracted with porcine pepsin in acetic acid for 48 hours at 4°C. The collagen extracted by pepsin had a much higher yield than the acid-extracted collagen. Furthermore, the spectra of both collagens that were obtained by FTIR were very similar; suggesting that hydrolysis with pepsin does not affect the secondary structure of collagen, especially the triple helix structure.

The method of extraction can influence the length of the polypeptide chains and the functional properties of collagen, such as viscosity, solubility, as well as water retention and emulsification capacity. This varies according to the processing parameters (enzyme, temperature, time and pH), the pre-treatment, method of storage and the properties of the initial raw material (Karim and Bhat, 2009).

Thus it is necessary to perform a partially controlled hydrolysis of the cross-linked bonds and the peptide bonds of the original structure of the collagen in order to obtain the ideal distribution of molar mass for a given application (Schreiber and Gareis, 2007). This factor has emphasized the use of selected animal or vegetable

proteolytic enzymes, such as trypsin, chymotrypsin, pepsin, pronase, alcalase, collagenases, bromelain and papain (Gómez-Guillén *et al.*, 2011; Khan *et al.*, 2011) because these permit the control of the degree of cleavage of the substrate protein. In addition, enzymatic hydrolysis presents some advantages compared with chemical hydrolysis, such as specificity, the control of the degree of hydrolysis, moderate conditions of action, and lower salt content in the final hydrolyzate. Furthermore, enzymes can be generally employed at very low concentrations and it is not necessary to remove them from the medium (Zavareze *et al.*, 2009). Despite the high cost of enzymatic hydrolysis, the fact that it results in lower levels of waste, better control of the process and higher yield justifies the use of enzymes.

#### *The use of ultrasound in the collagen extraction process*

Ultrasound is widely used to improve the transfer of mass by wet processes, which are of importance in terms of mixture, extraction and drying (Li *et al.*, 2009). Ultrasound has been used successfully in collagen extraction by reducing the processing time and increasing the yield (Kim *et al.*, 2012; Kim *et al.*, 2013; Ran and Wang, 2014; Tu *et al.*, 2015).

Ultrasound is a process that uses the energy of sound waves which are generated at a higher frequency than the hearing capacity of human beings (higher than 16 kHz) (Chemat and Khan, 2011). The effects of ultrasound in liquid systems are mainly due to the phenomenon known as cavitation (Hu *et al.*, 2013). During sonication, cavitation bubbles are quickly formed, which then suffer a violent collapse, resulting in extreme temperatures and pressures. This leads to turbulence and shearing in the cavitation zone (Chemat and Khan, 2011).

In a study by Kim *et al.* (2012), the extraction of acid-soluble collagen from the skin of Japanese sea bass (*Lateolabrax japonicus*) showed increased yield and reduced extraction time after ultrasonic treatment at a frequency of 20 kHz in 0.5 M acetic acid. Extraction with ultrasound did not alter the major components of the collagen, more specifically the  $\alpha_1$ ,  $\alpha_2$  and  $\beta$  chains.

Ran and Wang (2014) compared the extraction of collagen from bovine tendon with and without the use of ultrasound (20 kHz pulsed 20/20 seconds). Conventional extraction was performed with pepsin (50 U $mg^{-1}$  of sample) in acetic acid for 48 hours. For the extraction with ultrasound the same conditions were used, but the times of extraction with ultrasound (3 to 24 h) and pepsin (24 to 45 hours) were varied, resulting in a total of 48 hours of treatment. The

combination of ultrasound with pepsin resulted in a greater efficiency of collagen extraction, reaching a yield of 6.2%, when the conventional extraction yield was 2.4%. The adequate time for extraction using ultrasonic treatment was 18 h. The collagen that was extracted from bovine tendon showed a continuous helical structure, as well as good solubility and fairly high thermal stability. The use of ultrasound in conjunction with pepsin improved the efficiency of the extraction of natural collagen without damaging the quality of the resulting collagen.

Li *et al.* (2009) utilized ultrasound (40 kHz, 120 W) to extract collagen from bovine tendon using the enzyme pepsin. The results showed that ultrasound increased extraction by up to 124% and reduced the process time. These results were explained by the increased activity and dissolution of the substrate because irradiation allows for a greater dispersion of pepsin and opening of collagen fibrils, which facilitates the action of the enzyme. The use of circular dichroism analysis, atomic force microscopy and FTIR showed that the triple helix structure of the collagen remained intact, even after the ultrasonic treatment.

According to Kim *et al.* (2013) the use of ultrasound in the extraction of collagen generated a higher rate of yield than the conventional extraction method with 0.5 M acetic acid, even when

using a low concentration of acid (0.01 M). In addition, the yield of collagen from the skin of Japanese sea bass (*Lateolabrax japonicus*) increased greatly with increased treatment time and amplitude of ultrasound.

However, studies of the effect of ultrasound on enzyme activity are still very limited (Li *et al.*, 2009; Yu *et al.*, 2014). Yu *et al.* (2014) suggested that the activity of the enzymes papain and pepsin can be modified by ultrasound treatment, mainly due to changes in their secondary and tertiary structures. The activity of papain was inhibited, and the activity of pepsin was activated by the ultrasound treatment that was tested.

The application of ultrasound for a long period of time may give rise to elevated temperatures and shear strength, as well as high pressures within the medium because of cavitation. It can also break the hydrogen bonds and van der Waals forces in polypeptide chains, leading to the denaturation of the protein/enzyme (Ran and Wang, 2014).

## **Conclusions**

This review examined differences in collagen extraction processes because this is a key step in achieving higher yield, purity



and structural integrity of this protein, as well as saving time and reducing process costs.

Among the methods of extraction that were discussed, extraction by saline solution has lower yields and some limitations; for those reasons it is less commonly used. Acidic extraction can be efficient, but enzymatic extraction has some advantages, such as specificity, degree of control of hydrolysis, moderate action conditions and less waste; for those reasons it is more widely used. Nevertheless, extraction methods may favorably and unfavorably affect the characteristics of collagen, including thermal stability, molar mass, water-retaining capacity and gel-forming capacity.

The use of ultrasound has recently increased due to higher yields and reduced extraction time, without damaging the quality of collagen. However, further studies are needed to assess the effect of ultrasound on enzyme activity and the benefits of the use of ultrasound combined with other methods, mainly with a view for future industrial use.

The re-use of industrial by-products is of great importance in the search for cleaner and more sustainable production. In this context, collagen extraction is of great interest because it can add value to the by-products of animal slaughter.

## References

Abedin, M.Z., Karim, A.A., Gan, C.Y., Ghazali, F.C., Barzideh, Z., Zzaman, W. and Zaidul, I.S.M. 2015. Identification of angiotensin I converting enzyme inhibitory and radical scavenging bioactive peptides from sea cucumber (*Stichopus vastus*) collagen hydrolysates through optimization. *International Food Research Journal* 22(3): 1074-1082.

Almeida, P.F., Araújo, M.G.O. and Santana, J.C.C. 2012a. Collagen extraction from chicken feet for jelly production. *Acta Scientiarum. Technology* 34(3): 345-351.

Almeida, P.F., Vanalle, R.M. and Santana, J.C.C. 2012b. Produção de Gelatina: Uma perspectiva competitiva para a cadeia produtiva de frango de corte. *Produto & Produção* 13(2): 22-39.

Barzideh, Z., Latiff, A.A., Gan, C.Y., Abedin, M. and Alias, A.K. 2014. ACE inhibitory and antioxidant activities of collagen hydrolysates from the ribbon jellyfish (*Chrysaora* sp.). *Food Technology and Biotechnology* 52(4): 495-504.

Bernardini, R.D., Mullen, A.M., Bolton, D., Kerry, J., O'Neill, E. and Hayes, M. 2012. Assessment of the angiotensin-I-converting enzyme (ACE-I) inhibitory and antioxidant activities of hydrolysates of bovine brisket sarcoplasmic proteins produced by papain and characterisation of associated bioactive peptidic fractions. *Meat*

Science, 90(1): 226-235.

Bhaskar, N., Modi, V.K., Govindaraju, K., Radha, C. and Lalitha, R.G. 2007. Utilization of meat industry by products: protein hydrolysate from sheep visceral mass. *Bioresource Technology* 98(2): 388-394.

Callado A.K.C. and Teixeira M.F.S. 1998. Encefalopatias espongiforme transmissíveis e considerações sobre o agente etiológico. *Ciência Animal* 8(1): 13-21.

Cao, H. and Xu, S.Y. 2008. Purification and characterization of type II collagen from chicken sternal cartilage. *Food Chemistry* 108(2): 439-445.

Chemat, F. and Khan, M.K. 2011. Applications of ultrasound in food technology: processing, preservation and extraction. *Ultrasonics Sonochemistry* 18(4): 813-835.

Cliche, S., Amiot, J., Avezard, C. and Gariépy, C. 2003. Extraction and characterization of collagen with or without telopeptides from chicken skin. *Poultry Science* 82(3): 503-509.

Damodaran S., Parkin, K. and Fennema, O.R. 2010. *Química de alimentos de fennema*. p. 726-730. 4ª ed. São Paulo: Artmed.

Ding J.F., Li Y.Y., Xu J.J., Su X.R., Gao X. and Yue F.P. 2011. Study on effect of jellyfish collagen hydrolysate on anti-fatigue and anti-oxidation. *Food Hydrocolloids*, 25(5): 1350-1353.

Gómez-Guillén, M.C., Giménez, B., López-Caballero, M.A. and Montero, M.P. 2011. Functional and bioactive properties of collagen and gelatin from alternative sources: A review. *Food Hydrocolloids* 25(8): 1813-1827.

Hashim, P., Ridzwan, M.M. and Bakar, J. 2014. Isolation and characterization of collagen from chicken feet. *International Journal of Biological, Veterinary, Agricultural and Food Engineering* 8(3): 242-246.

Hu, H., Fan, X., Zhou, Z., Xu, X., Dan, G., Wang, L., Huang, X., Pan, S. and Zhu, L. 2013. Acid-induced gelation behavior of soybean protein isolate with high intensity ultrasonic pre-treatments. *Ultrasonic Sonochemistry* 20(1): 187-195.

Jayathilakan, K., Sultana, K., Radhakrishna, K. and Bawa, A.S. 2012. Utilization of by-products and waste materials from meat, poultry and fish processing industries: a review. *Journal of Food Science and Technology* 49(3): 278-293.

Jia, J., Zhou, Y., Lu, J., Chen, A., Li, Y. and Zheng, G. 2010. Enzymatic hydrolysis of Alaska pollack (*Theragra chalcogramma*) skin and antioxidant activity of the resulting hydrolysate. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 90(4): 635-640.

Kaewdang, O., Benjakul, S., Kaewmanee, T. and Kishimura, H. 2014. Characteristics of collagens from the swim bladders of yellowfin tuna (*Thunnus albacares*). Food Chemistry 155: 264-270.

Karim, A.A. and Bhat, R. 2009. Fish gelatin: properties, challenges, and prospects as an alternative to mammalian gelatins. Food Hydrocolloids 23(3): 563–576.

Khan, M.I., Arshad, M.S., Anjum, F.M., Sameen, A., Rehman, A. and Gill, W. 2011. Meat as a functional food with special reference to probiotic sausages. Food Research International 44(10): 3125-3133.

Kim, H.K., Kim, Y.H., Kim, Y.J., Park, H.J. and Lee, N.H. 2012. Effects of ultrasonic treatment on collagen extraction from skins of the sea bass *Lateolabrax japonicus*. Fisheries Science 78(2): 485-490.

Kim, H.K., Kim, Y.H., Park, H.J. and Lee, N.H. 2013. Application of ultrasonic treatment to extraction of collagen from the skins of sea bass *Lateolabrax japonicus*. Fisheries Science 79(5): 849-856.

Kim, S.E. and Mendis, E. 2006. Bioactive compounds from marine processing byproducts – a review. Food Research International 39(4): 383-393.

Kittiphattanabawon, P., Benjakul, S., Visessanguan, W. and Shahidi, F. 2010. Isolation and characterization of collagen from the cartilages of brownbanded bamboo shark (*Chiloscyllium punctatum*) and blacktip shark (*Carcharhinus limbatus*). *LWT-Food Science and Technology* 43(5): 792-800.

Kittiphattanabawon, P., Benjakul, S., Sinthusamran, S. and Kishimura, H. 2015. Characteristics of collagen from the skin of clown featherback (*Chitala ornata*). *International Journal of Food Science and Technology* 50(9): 1972-1978.

Lafarga, T. and Hayes, M. 2014. Bioactive peptides from meat muscle and by-products: generation, functionality and application as functional ingredients. *Meat Science* 98(2): 227-239.

Ledward, D.A. 2000. Gelatin. In *Handbook of hydrocolloids*, ed G. O. Philips, P.A. Williams. p. 67-86. Woodhead Publishing Limited.

Li, D., Mu, C., Cai, S. and Lin, W. 2009. Ultrasonic irradiation in the enzymatic extraction of collagen. *Ultrasonics Sonochemistry* 16(5): 605-609.

Li, Z.R., Wang, B., Chi, C.F., Zhang, Q.H., Gong, Y.D., Tang, J.J., Luo, H.Y. and Ding, G.F. 2013. Isolation and characterization of acid soluble collagens and pepsin soluble collagens from the skin

and bone of Spanish mackerel (*Scomberomorus niphonius*). Food Hydrocolloids 31(1): 103-113.

Liang, Q., Wang, L., Sun, W., Wang, Z., Xu, J. and Ma, H. 2014. Isolation and characterization of collagen from the cartilage of Amur sturgeon (*Acipenser schrenckii*). Process Biochemistry 49(2): 318-323.

Lin, Y.K., Lin, T.Y. and Su, H.P. 2011. Extraction and characterisation of telopeptide-poor collagen from porcine lung. Food Chemistry 124(4): 1583-1588.

Liu, D., Wei, G., Li, T., Hu, J., Lu, N., Regenstein, J. M. and Zhou, P. 2015. Effects of alkaline pretreatments and acid extraction conditions on the acid-soluble collagen from grass carp (*Ctenopharyngodon idella*) skin. Food Chemistry 172: 836-843.

Liu, D., Liang, L., Regenstein, J.M. and Zhou, P. 2012. Extraction and characterisation of pepsin-solubilised collagen from fins, scales, skins, bones and swim bladders of bighead carp (*Hypophthalmichthys nobilis*). Food Chemistry 133(4): 1441-1448.

Martins, V.G., Costa, J.A.V. and Hernandez, C.P. 2009. Hidrolizado protéico de pescado obtido por vias química e enzimática a partir de corvina. Química Nova 32(1): 61-66.

Mahboob, S. 2015. Isolation and characterization of collagen from fish waste material- skin, scales and fins of *Catla catla* and

*Cirrhinus mrigala*. Journal of Food Science and Technology-Mysore 52(2): 4296-4305.

Moraes, M.C. and Cunha, R.L. 2013. Gelation property and water holding capacity of heat-treated collagen at different temperature and pH values. Food Research International 50(1): 213-223.

Munasinghe, K.A., Schwarz, J.G. and Whittiker, M. 2015. Utilization of Chicken By-Products to Form Collagen Films. Journal of Food Processing 2015: 1-6.

Muralidharan, N., Shakila, R.J., Sukumar, D. and Jeyasekaran, G. 2013. Skin, bone and muscle collagen extraction from the trash fish, leather jacket (*Odonus niger*) and their characterization. Journal of Food Science and Technology 50(6): 1106-1113.

Nagai, T. 2015. Characterization of collagen from emu (*Dromaius novaehollandiae*) skins. Journal of Food Science and Technology 52(4): 2344-2351.

Nelson, D.L. and Cox, M.M., 2005. Lehninger. Principles of Biochemistry. 4 ed. New York: W. H. Freeman. 1119 p.

Ninan, G., Joseph, J. and Aliyamveetil, Z.A. 2014. A comparative study on the physical, chemical and functional



properties of carp skin and mammalian gelatins. *Journal of Food Science and Technology* 51(9): 2085-2091.

Nollet, L.M.L. and Toldrá, F. 2011. *Handbook of Analysis of Edible Animal By-Products*. p. 3-11. CRC Press: Gent, Belgium.

Paschalis, E.P., Verdelis, K., Doty, S.B., Boskey, A.L., Mendelsohn, R. and Yamauchi, M. 2001. Spectroscopic characterization of collagen cross-links in bone. *Journal of Bone and Mineral Research* 16(10): 1821-1828.

Prestes, R.C. 2013. Colágeno e seus derivados: características e aplicações em produtos cárneos. *Revista Unopar Científica Ciências Biológicas e da Saúde* 15(1): 65-74.

Ran, X.G. and Wang, L.Y. 2014. Use of ultrasonic and pepsin treatment in tandem for collagen extraction from meat industry by-products. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 94(3): 585-590.

Saiga, A., Iwai, K., Hayakawa, T., Takahata, Y., Kitamura, S., Nishimura, T. and Morimatsu, F. 2008. Angiotensin I-converting enzyme inhibitory peptides obtained from chicken collagen hydrolysate. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 56(20): 9586-9591.

Saito, M., Kiyose, C., Higuchi, T., Uchida, N. and Suzuki, H. 2009. Effect of collagen hydrolysates from salmon and trout skins on

the lipid profile in rats. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 57(21): 10477-10482.

Santos, M.H., Silva, R.M., Dumont, V.C., Neves, J.S., Mansur, H.S. and Heneine, L.G.D. 2013. Extraction and characterization of highly purified collagen from bovine pericardium for potential bioengineering applications. *Materials Science and Engineering: C* 33(2): 790-800.

Schrieber R. and Gareis H. 2007. *Gelatine handbook: theory and industry practice*. Hardcover. 348p.

Shimokomaki M, Olivo R, Terra N.N. and Franco B.D.G.M. 2006. *Atualidades em ciência e tecnologia de carnes*. São Paulo: Varela. 236p.

Sinthusamran, S., Benjakul, S. and Kishimura, H. 2013. Comparative study on molecular characteristics of acid soluble collagens from skin and swim bladder of seabass (*Lates calcarifer*). *Food Chemistry* 138(4): 2435-2441.

Skierka, E. and Sadowska, M. 2007. The influence of different acids and pepsin on the extractability of collagen from the skin of Baltic cod (*Gadus morhua*). *Food Chemistry*, 105(3): 1302-1306.

Silva, T.F. and Penna, A.L.B. 2012. Colágeno: Características químicas e propriedades funcionais. *Revista do Instituto Adolfo Lutz* 71(3): 530-539.

Subhan, F., Ikram, M., Shehzad, A. and Ghafoor, A. (2015). Marine Collagen: An Emerging Player in Biomedical applications. *Journal of Food Science and Technology* 52(8): 4303-4307.

Tang, L., Chen, S., Su, W., Weng, W., Osako, K. and Tanaka, M. 2015. Physicochemical properties and film-forming ability of fish skin collagen extracted from different freshwater species. *Process Biochemistry* 50(1): 148-155.

Toldrá, F., Aristoy, M., Mora, L. and Reig, M. 2012. Innovations in value-addition of edible meat by-products. *Meat Science*, 92(3) 290-296.

Tu, Z.C., Huang, T., Wang, H., Sha, X.M., Shi, Y., Huang, X.Q., Man, Z.Z. and Li, D.J. 2015. Physico-chemical properties of gelatin from bighead carp (*Hypophthalmichthys nobilis*) scales by ultrasound-assisted extraction. *Journal of food science and technology* 52(4): 2166-2174.

Voet, D., Voet, J. and Pratt, C.F.D.B. 2006. *Fundamentos de bioquímica*. 3ª Ed. Porto Alegre: Armed.

Wang, J., Wang, Y., Tang, Q., Wang, Y., Chang, Y., Zhao, Q. and Xue, C. 2010. Antioxidation activities of low-molecular-weight gelatin hydrolysate isolated from the sea cucumber *Stichopus japonicus*. *Journal of Ocean University of China* 9(1): 94-98.

Wang, L., Liang, Q., Chen, T., Wang, Z., Xu, J. and Ma, H. 2014. Characterization of collagen from the skin of Amur sturgeon (*Acipenser schrenckii*). Food Hydrocolloids 38: 104-109.

Wang, L., Yang, B., Du, X., Yang, Y. and Liu, J. 2008. Optimization of conditions for extraction of acid-soluble collagen from grass carp (*Ctenopharyngodon idella*) by response surface methodology. Innovative Food Science & Emerging Technologies 9(4): 604-607.

Ward, A.G. and Courts, A. 1977. The Science and Technology of Gelatin – A Series of Monographs. London: Academic Press.

Woo, J.W., Yu, S.J., Cho, S.M., Lee, Y.B. and Kim, S.B. 2008. Extraction optimization and properties of collagen from yellowfin tuna (*Thunnus albacares*) dorsal skin. Food Hydrocolloids 22(5): 879-887.

Yang, H. and Shu, Z. 2014. The extraction of collagen protein from pigskin. Journal of Chemical and Pharmaceutical Research 6(2): 683-687.

Yu, Z. L., Zeng, W.C., Zhang, W.H., Liao, X.P. and Shi, B. 2014. Effect of ultrasound on the activity and conformation of  $\alpha$ -amylase, papain and pepsin. Ultrasonics Sonochemistry 21(3): 930-936.

Zavareze, E.R., Silva, C.M., Mellado, M.S. and Prentice-Hernández, C. 2009. Funcionalidade de hidrolisados proteicos de

cabrinha (*Prionotus punctatus*) obtidos a partir de diferentes proteases microbianas. Química. Nova 32(7): 1739-1743.

Table 1. Some procedures used in the extraction of collagen from animal waste reported in the literature.

Raw Material	Pre-treatment	Extraction procedure	Reference
Emu skin ( <i>Dromaius novaehollandiae</i> )	Homogenization with 10% ethanol for 4 days. Extraction with 0.1 M NaOH for 2 days. Washing with distilled water for 2 days. Lyophilization.	Consecutive extractions with 0.5 M acetic acid for 48 h, 0.9 M NaCl in 0.5 M acetic acid and pepsin (10%) in 0.5 M acetic acid for 4 days.	Nagai <i>et al.</i> (2015)
Japanese sturgeon skin ( <i>Acipenser schrenckii</i> )	Homogenization with 20% NaCl three times at 4°C.	Extraction with 0.45 M NaCl 1:100 (w/v) for 24 h. Followed by acid extraction with 0.5M acetic acid twice for 24 h. Followed by extraction with pepsin (0.1%) in 0.01 M HCl for 48 hours. All operations were performed at 4°C.	Wang <i>et al.</i> (2014)
Brownbanded bamboo shark ( <i>Chiloscyllium punctatum</i> ) and blacktip shark ( <i>Carcharhinus limbatus</i> ) cartilage	Fat removal with 0.1 M NaOH 1:10 (w/v) for 6 h and 0.5 M EDTA decalcification, 1:10 (w/v) for 40 h, both at 4°C.	Acid hydrolysis with 0.5 M acetic acid 1:15 (w/v) for 48 h followed by enzymatic hydrolysis with porcine pepsin (40 units/g of residue) in 0.5 M acetic acid 1:15 (w/v) for 48 h, both at 4°C.	<u>Kittiphatanabawon</u> <i>et al.</i> (2010)
Bovine Achilles tendo	Washing with 0.15 M NaCl and acetone.	Enzymatic hydrolysis with pepsin in 0.5 M acetic acid for 2 days at 20°C. With and without ultrasound (40 kHz, 120 W, pulsed 30/30 minutes).	Li <i>et al.</i> (2009)

Table 1. Continuation.

Raw Material	Pre-treatment	Extraction procedure	Reference
Yellowfin tuna ( <i>Thunnus albacares</i> ) swim bladder	Extraction with 0.15 M NaOH 1:10 (w/v) for 2 h at 4°C and 10% butyl alcohol, 1:10 (w/v) for 12 h. Washing with cold distilled water three times.	Extraction with 0.5 M acetic acid, 1:10 (w/v) for 48 h at 4°C. Enzymatic hydrolysis with extract of stomach of yellowfin tuna (20 units/g of swim bladder) in 0.5 M acetic acid 1:10 (w/v) for 48 h at 4°C.	Kaewdang <i>et al.</i> (2014)
Bovine pericardium	Immersion in 0.1 M NaOH for 48 h at 4°C.	Extraction with pepsin in 10 mM hydrochloric acid 1:20 (w/v) for 12 h at 4°C.	Santos <i>et al.</i> (2013)
Japanese seerfish ( <i>Scomberomorus niphonius</i> ) skin and bones	<b>Skin:</b> Fat removal with 0.1 M NaOH 1:10 (w/v) for 2 days at 4°C. Washing with cold water until neutral pH. Extraction with 10% butyl alcohol for 2 days. <b>Bones:</b> Extraction with 0.1 M NaOH 1:20 (w/v) for 48 h. Washing with cold water until neutral pH. Descaling with 0.5 M EDTA-2Na for 5 days. Extraction with 10% butyl alcohol for 2 days.	<b>Skin:</b> Extraction with 0.5 M acetic acid, 1:15 (w/v) for 24 h, followed by extraction with porcine pepsin (750 U/mg dry weight) in 0.5 M acetic acid, 1:15 (w/v) at 4°C for 2 days. <b>Bones:</b> Extraction with 0.5 M acetic acid, 1:15 (w/v) for 3 days. Subsequent extraction with porcine pepsin (20 U/g of residue) in 0.5 M acetic acid at 4°C for 2 days.	Li <i>et al.</i> (2013)





### **3.2. Manuscrito 2**

## **OBTENÇÃO, CARACTERIZAÇÃO E AVALIAÇÃO DAS PROPRIEDADES FUNCIONAIS DO COLÁGENO DE RESÍDUO DE CMS DE FRANGO**

**Artigo em fase final de revisão para ser submetido à Revista Poultry Science**  
(Formatado conforme as normas da revista)

## COLÁGENO DE FRANGO

### **Obtenção, caracterização e avaliação das propriedades funcionais do colágeno de resíduo de cms de frango**

Michele M. Schmidt<sup>†\*</sup>, Alessandra R. Vidal<sup>†</sup>, Rosa C. P. Dornelles<sup>†</sup>, Ernesto H. Kubota<sup>†</sup>,  
Renius O. Mello<sup>†</sup>, Ivo M. Demiate<sup>‡</sup>, José P. Wojeicchowski<sup>‡</sup>

Scientific section: Processing and Products

<sup>†</sup> Federal University of Santa Maria, Department of Science and Food Technology, Avenida Roraima, 1000, 97105-900, Camobi, Santa Maria RS, Brazil.

<sup>‡</sup> State University of Ponta Grossa, Department of Food Engineering, Avenida General Carlos Cavalcanti, 4748, 84030-000, Ponta Grossa PR, Brazil.

\*Corresponding author: Michele M. Schmidt. Address: Rua Silva Jardim, nº 1892, apto 303, 97010-492, centro, Santa Maria, Rio Grande do Sul, Brazil, Tel: +55 55 91355181 e +55 55 33175181. E-mail: [mixi.schmidt@gmail.com](mailto:mixi.schmidt@gmail.com)

**RESUMO** A produção mundial de carne de frango em 2016 foi de 88,718 milhões de toneladas, 20% da produção é destinada para elaboração de carne mecanicamente separada (CMS), assim a obtenção de colágeno a partir do resíduo de CMS pode ser uma alternativa para agregar valor a este resíduo. O objetivo deste estudo foi a obtenção, caracterização e avaliação das propriedades funcionais do colágeno solúvel em pepsina extraído do resíduo de CMS de frango. O colágeno obtido apresentou rendimento de 13,00% em base seca e elevada estabilidade térmica, 46,5 °C, sendo constituído principalmente por colágeno do tipo I. Além disso, mostrou características semelhantes aos colágenos de outras aves, mamíferos e pescados, como a composição de aminoácidos, o espectro FTIR, a solubilidade elevada em pH ácido, e ainda mostrou índice de atividade emulsificante (49,27 m<sup>2</sup>/g) superior a gelatinas convencionais. Diante disso, o resíduo de CMS de frango comprovou ser uma fonte viável para extração de colágeno e, o colágeno deste resíduo se mostrou promissor como alternativa aos colágenos de mamíferos e com potencial de aplicação industrial, tornando possível a agregação de valor aos resíduos gerados na elaboração da CMS de frango.

**Palavras-chave:** Pepsina; FTIR; Carne mecanicamente separada; Propriedades funcionais; Eletroforese.

## INTRODUÇÃO

Em 2016 a produção mundial de carne de frango foi 88,718 milhões de toneladas, o Brasil é o segundo maior produtor mundial, com 12,69 milhões de toneladas (ABPA, 2017).

De acordo com Negrão et al. (2005) cerca de 20% da produção de frango são transformadas em carne mecanicamente separada (CMS). O resíduo do processo de separação é da ordem de 15% a 45%, dependendo do tipo de matéria-prima empregada e do equipamento utilizado, geralmente este resíduo é destinado para fabricação de ração, devido

ao seu baixo custo. A obtenção de colágeno permitiria agregar valor aos resíduos de CMS, pois este produto possui um elevado preço de comercialização, principalmente na forma de colágeno hidrolisado.

O colágeno é a proteína animal mais abundante, sendo o principal constituinte da pele, tendões, cartilagens, ossos e dos tecidos em geral, compreendendo cerca de 30% da proteína animal total (Damodaran et al., 2010). O colágeno apresenta inúmeras aplicações nas indústrias farmacêutica, cosmética, fotográfica e alimentícia (Kim and Mendis, 2006; Gómez-Guillén et al., 2011).

Tradicionalmente, o colágeno é extraído a partir de subprodutos de mamíferos, como pele e ossos suínos e bovinos. No entanto, a ocorrência de doenças como a Encefalopatia Espongiforme Bovina (BSE) e a febre aftosa provocam preocupações quanto à sua segurança (Jeevithan et al., 2014).

Diversos subprodutos do abate de animais, principalmente de pescados, já foram estudados como alternativa aos colágenos tradicionais, entre eles a pele, escamas e ossos de carpa comum (*Cyprinus carpio*) (Duan, et al., 2009), pés de frango (Hashim et al., 2014), nadadeiras de atum (*Thunnus albacares*) (Kaewdang et al., 2014), pele de Ema (*Dromaius novaehollandiae*) (Nagai et al., 2015), pele de rohu (*Labeo rohita*) (Sayedboworn et al., 2016) e pele e bexiga natatória de carpa capim (*Ctenopharyngodon idella*) (Wu et al., 2016), porém há uma lacuna na literatura sobre o uso do resíduo de CMS como matéria-prima para obtenção de colágeno.

Este estudo teve como objetivo a obtenção, caracterização e avaliação das propriedades funcionais do colágeno solúvel em pepsina extraído do resíduo de CMS de frango.

## MATERIAL E MÉTODOS

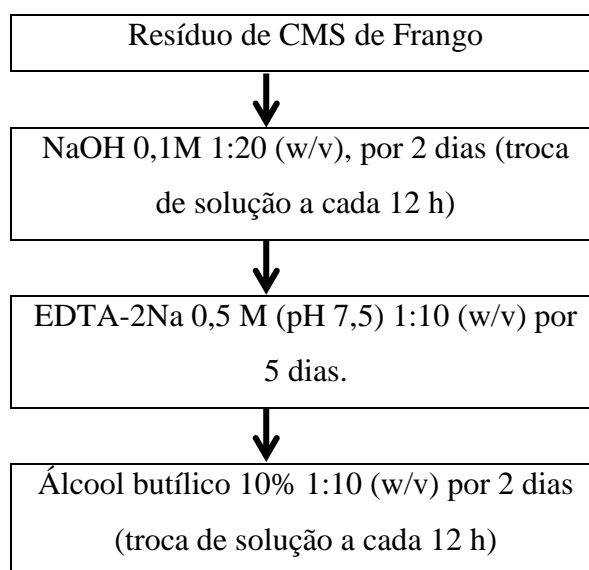
A matéria-prima congelada (resíduo do processo de extração de CMS de frango) foi doada pela Cooperativa Central Aurora (Aurora Alimentos) unidade de Erechim (RS), obtida em máquina High Tech, modelo: HT- 6.0 SS, capacidade: 6000 kg/h, potência: 50 CV, peso: 1680 kg. O resíduo de CMS foi mantido sob congelamento em freezer (Metalfrio, VF50F) a - 22 °C.

### *Caracterização da matéria-prima*

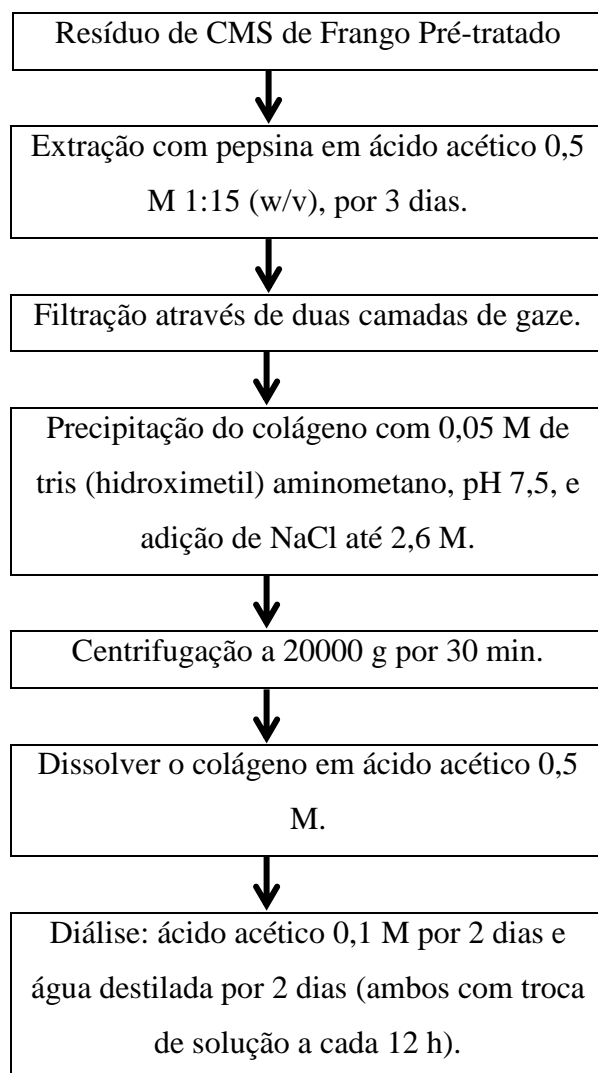
Para caracterização do resíduo foram realizadas as seguintes determinações: pH (determinação eletrométrica), lipídios (extração direta em Soxhlet), protídios (método Kjeldahl modificado), umidade (a 105 °C), cinzas (incineração a 550 °C) e determinação do aminoácido hidroxiprolina, seguindo metodologias do IAL (2008). O teor de cálcio nas cinzas foi determinado pela metodologia de Ferro and Ham (1957).

### *Obtenção do colágeno*

#### **Pré-tratamento:**



### Extração:



**Pré-tratamento** O pré-tratamento do resíduo de CMS de frango foi realizado de acordo com metodologia de Li et al. (2013) e Duan et al. (2009) com modificações. Inicialmente as proteínas não colagenosas foram removidas com solução de hidróxido de sódio (NaOH) 0,1M por dois dias, com razão amostra/solução alcalina 1:20 (p/v), com troca da solução a cada 12 horas. Para descalcificação foi utilizada solução de EDTA-2Na (Ácido Etilenodiaminatetracético Dissódico) 0,5 M (pH 7,5) por cinco dias, com razão amostra/solução 1:10 (p/v). A gordura foi extraída com álcool butílico 10% por dois dias, com razão sólido/solvente de 1:10 (p/v), com troca do solvente a cada 12 horas. Todos os

processos foram realizados sob agitação em Incubadora Shaker (Solab SL-223, Piracicaba, Brasil) a 150 rpm e 4 °C.

Após o pré-tratamento as amostras foram armazenadas sob congelamento em freezer (Metalfrio, VF50F) a -22 °C.

**Extração enzimática** Após o pré-tratamento o colágeno solúvel em pepsina foi extraído seguindo metodologia proposta por Kittiphattanabawon et al. (2010) com modificações. O resíduo de CMS foi adicionado de ácido acético 0,5 M, contendo a enzima pepsina (extraída da mucosa gástrica porcina, em pó,  $\geq 400$  unidades/mg de proteína, Sigma, St. Louis, USA), na proporção 1:2,50 enzima/proteína, com razão sólido/solvente de 1:15 (p/v), a mistura foi agitada continuamente em Incubadora Shaker (Solab SL-223, Piracicaba, Brasil) a 150 rpm e 4 °C por três dias, seguido de filtração através de duas camadas de gaze. O resíduo foi então re-extraído nas mesmas condições e ambos filtrados foram combinados.

Posteriormente, o colágeno presente no filtrado foi precipitado na presença de 0,05 M de tris (hidroximetil) aminometano, em pH 7,5, através da adição de NaCl até concentração final de 2,6 M. O colágeno precipitado foi centrifugado a 12000 rpm por 30 minutos, em centrífuga refrigerada (Hitachi, CR22GIII) a 4 °C. Depois de centrifugado o colágeno foi redissolvido em cerca de 50 mL de ácido acético 0,5 M, para posterior diálise em membrana de celulose (Typical molecular weight cut-off 14,000 KDa, Sigma, St. Louis, USA), realizada durante dois dias com ácido acético 0,1 M e por dois dias com água destilada, ambos a 4 °C sob agitação e com troca da solução a cada 12 horas. Após a diálise, o colágeno foi congelado em freezer (Metalfrio, VF50F) a -22 °C e liofilizado em liofilizador (Terroni, LS 3000, São Carlos, Brasil).

**Rendimento** O rendimento do colágeno foi calculado com base no peso úmido e seco do material de partida:

$$\text{Rendimento}(\%) = \frac{\text{peso do colágeno liofilizado (g)}}{\text{peso inicial (úmido ou seco) do resíduo de CMS (g)}} \times 100$$

### **Caracterização do colágeno**

**Composição centesimal** Foram determinados lipídios, protídios, umidade e cinzas, conforme IAL (2008).

**Perfil de aminoácidos** As proteínas presentes na amostra foram hidrolisadas com ácido clorídrico (HCl) 6M durante 24 horas a 110 °C. Os aminoácidos liberados durante a hidrólise ácida reagem com fenilisotiocianato (PITC), separados por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) em fase reversa e detectados por ultravioleta (UV). A quantificação foi feita por calibração interna multinível segundo a metodologia descrita por LAMIC (2017).

**Espectroscopia de Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR)** As características estruturais foram avaliadas através da análise de Espectroscopia de Infravermelho com Transformada de Fourier – FTIR em equipamento Shimadzu IR Prestige-21 (Shimadzu Corporation, Japan) utilizando a técnica de reflectância total atenuada (ATR) no intervalo de 400 a 4.000  $\text{cm}^{-1}$ . Foram realizadas 16 varreduras por espectro e 2  $\text{cm}^{-1}$  de resolução.

**Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC)** A curva de DSC foi obtida em um equipamento DSC-Q200 (TA-Instruments, EUA), o qual foi previamente calibrado com índio de alto grau de pureza de 99,99%,  $\text{pf} = 156,6 \text{ }^\circ\text{C}$ ,  $\Delta H = 28,56 \text{ J g}^{-1}$ . Para registrar a entalpia e



as temperaturas do processo de desnaturação do colágeno, foram utilizados os seguintes parâmetros: fluxo de ar de 50 mL min<sup>-1</sup>, razão de aquecimento de 10 °C min<sup>-1</sup> e faixa de aquecimento de -20 a 100 °C. Foram pesadas cerca de 3,0 mg de amostra, que foi misturada com água deionizada em uma proporção de 6:1 (água: colágeno, m/m) e a mistura foi mantida em repouso durante 120 minutos sob refrigeração (7 °C) a fim de equilibrar o teor de umidade e hidratar. A análise foi realizada em cadinhos de alumínio selados.

***Análise de eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE)*** A análise de eletroforese em gel foi baseada no método proposto por Laemmli (1970) com modificações. As amostras foram diluídas em água e posteriormente foram adicionados 40 µL de ácido tricloroacético (TCA) 60% e 100 µL de água milliQ em 200 µL de amostra em tubos de centrífuga do tipo eppendorfs, esta solução foi armazenada em freezer durante uma noite (12 horas). Posteriormente as amostras foram centrifugadas a 10.000 rpm, 4 °C por 30 minutos, o sobrenadante foi retirado, tomando cuidado para que o pellet não fosse desfeito. Foi adicionado 100 µL de solução gelada de acetona 90%, a fim de lavar o pellet sem desfazê-lo, foi feita nova centrifugação por 30 minutos. Novamente o sobrenadante foi removido e adicionado mais 100 µL de acetona 90% gelada e centrifugado nas mesmas condições, removendo novamente o sobrenadante. O precipitado foi ressuspensionado com 50 µL do tampão da amostra com 5% de β-mercaptoetanol. Em seguida, as amostras foram desnaturadas em banho-maria a 100 °C por 10 minutos.

Foram utilizados gel de resolução 15% e gel de empilhamento 5%, onde foram adicionados 20 µL das amostras a serem analisadas e 15 µL do padrão de massa molar e submeteu-se a eletroforese a 150 V e 30 mA, num tempo de aproximadamente 2 horas, em cuba de eletroforese vertical. Subsequentemente, o gel foi corado com Coomassie Brilliant Blue R-250 (Bio-Rad Laboratories Inc., Richmond, VA, USA) 0,1% por aproximadamente 12

horas. Posteriormente o gel foi descorado com aquecimento em água destilada em micro-ondas até a perfeita visualização das bandas.

### ***Avaliação das propriedades funcionais do colágeno***

***Solubilidade*** A solubilidade foi determinada pelo método de Montero *et al.* (1991) com modificações. As amostras foram dissolvidas em ácido acético 0,5 M para se obter uma concentração final de 3 mg/mL e a mistura foi agitada a 4 °C até as amostras serem completamente solubilizadas. As soluções (8 mL) foram transferidas para um tubo de centrífuga de 50 mL e o pH ajustado de 1,0 até 10,0, com NaOH ou HCl. O volume final foi completado até 10 mL com água destilada com pH previamente ajustado para o mesmo pH da solução de colágeno. As soluções foram lentamente agitadas a 4 °C durante 30 min e centrifugadas a 10.000 rpm e 4 °C durante 30 minutos. O teor de proteína no sobrenadante foi determinado pelo método de Lowry *et al.* (1951), utilizando albumina de soro bovino (Sigma, St. Louis, USA) como padrão. A solubilidade relativa do colágeno foi calculada em comparação com a obtida no pH com maior solubilidade, tornando esta 100%.

***Propriedades da Espuma*** A capacidade de formação de espuma (CFE) e a estabilidade da espuma (EEs) foram medidos com base no método de Shahidi *et al.* (1995). Soluções da amostra (20 mL) em diferentes concentrações, 0,25, 0,5 e 1,0%, foram misturadas em tubo Falcon (50 mL) utilizando ultra homogeneizador Turrax (Tecnal TE-102 Piracicaba, Brasil) a uma velocidade de 10.000 rpm para incorporar ar durante 2 minutos a temperatura ambiente (20-25 °C).

A CFE foi calculada como a % de aumento de volume baseando-se no volume inicial e após a formação de espuma, conforme a equação:

$$\text{CFE (\%)} = \frac{(V - V_0)}{V_0} \times 100$$

Onde  $V_0$  é o volume antes da agitação (mL) e  $V$  é o volume depois da agitação (mL).

A determinação da EEs foi medida através do repouso da amostra à temperatura ambiente, com leitura do volume após intervalos de 1, 10, 30 e 60 min, sendo a estabilidade calculada pela equação:

$$\text{EEs} = \frac{V_t}{V_0} \times 100$$

Sendo  $V_t$  o volume final de espuma, após cada intervalo de tempo (mL), e  $V_0$  corresponde ao volume inicial da espuma formada (mL).

**Propriedades emulsificantes** O índice de atividade emulsionante (EAI) e o índice de estabilidade da emulsão (ESI) foram calculados com base no método de Pearce and Kinsella (1978). Óleo de soja (10 mL) e solução de amostra (30 mL, 0,1%) foram misturados em ultra homogeneizador Turrax (Tecnal TE-102 Piracicaba, Brasil) a uma velocidade de 12.000 rpm durante 1 min, e 50  $\mu$ L da emulsão foi pipetada a partir do fundo do recipiente, a 0 e 10 min após a homogeneização, e diluída 100 vezes utilizando uma solução de SDS (dodecil sulfato de sódio) a 0,1%. A absorvância da solução diluída foi determinada a 500 nm usando um espectrofotômetro (Servylab, UV – M51, B, São Leopoldo, RS, Brasil). As absorvâncias, determinadas imediatamente (0 min) e 10 min após a formação da emulsão, foram utilizadas para calcular o EAI e o ESI com as seguintes equações:

$$\text{EAI} \left( \frac{\text{m}^2}{\text{g}} \right) = \frac{(2 \times 2,303 \times A_0)}{(0,25 \times \text{concentração de colágeno})}$$

$$\text{ESI (min)} = \frac{A_0 \times 10 \text{ min}}{A_0 - A_{10}}$$

Onde  $A_0$  é a absorvância determinada imediatamente após a formação da emulsão (0 min) e  $A_{10}$  a absorvância determinada 10 min após a formação da emulsão.

**Digestibilidade *in vitro*** Para determinação da digestibilidade *in vitro* foi seguida metodologia descrita por Sperotto (2014), inicialmente pesou-se uma quantidade de amostra que corresponde ao equivalente a 0,5 g de proteína, preparou-se uma solução de 1,5 mg de pepsina (extraída da mucosa gástrica porcina, em pó,  $\geq 400$  unidades/mg de proteína, Sigma, St. Louis, USA) por mL de HCl 0,1 N e adicionou-se 15 mL desta solução a amostra. Após adicionou-se 0,5 mL de solução de Merthiolate incolor (Brainfarma Indústria Química e Farmacêutica S/A, Anápolis, Brasil), homogeneizou-se bem e levou-se a banho-maria a 37 °C por 3 horas, com agitação periódica. Decorrido este tempo os tubos contendo as amostras foram resfriados e a solução foi ajustada a pH 8,0 com uma solução de NaOH 0,2 N, utilizando um potenciômetro digital (MS Tecnopon, mPA210) de bancada. Foi adicionado 10 mL de solução de pancreatina (Sigma, St. Louis, USA) (0,5 mg/mL em tampão fosfato pH 8,0) ao produto hidrolisado pela pepsina e levado novamente ao banho-maria a 37 °C, porém por 24 horas com agitação periódica. Após o tempo de hidrolise foram adicionados 5 mL de uma solução de ácido tricloroacético 5% a amostra e esta mistura foi então centrifugada por 15 minutos a 4.000 rpm para separação do material insolúvel, sendo o sobrenadante recolhido para determinação do nitrogênio digerido, pelo método de Kjeldhal. A digestibilidade *in vitro* foi expressa como porcentagem de proteína digerida em relação a proteína total na amostra inicial.

**Viscosidade** A viscosidade do colágeno foi medida usando o método de Kittiphattanabawon et al. (2005) com modificações. Foram preparados 500 mL de solução de colágeno dissolvido em ácido acético 0,1 M para obter uma concentração de 0,03% (p/v). A solução foi sujeita a

medição da viscosidade utilizando um viscosímetro *Brookfield* (RV-DV-II +Pro) com haste Nº 1 e velocidade de 100 rpm, nas temperaturas de 10, 25 e 50 °C, utilizando um banho termostaticado (Haake, Fisons F3 C) à temperatura designada, a solução foi mantida durante 30 minutos antes da determinação da viscosidade.

### ***Análise Estatística***

Para extração do colágeno foram realizadas três repetições e todas as análises foram realizadas em triplicata. Os resultados foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e teste de Tukey, com nível de significância de 5% ( $p < 0,05$ ), utilizando Statistica ®8.0 (StatSoft Inc., Tulsa, OK, EUA).

Após a obtenção dos espectros por FTIR, cada espectro foi tratado com a absorvância normalizada entre 0 e 1, suavizada (15 pontos), corrigida na linha de base e removida a zona de CO<sub>2</sub> usando o software Shimadzu IRsolution 1.40. Em seguida, uma tabela com todos os dados foi construída usando o comprimento de onda como coluna e as amostras como linhas, e então testou-se a primeira e segunda derivadas dos espectros utilizando o procedimento EXPAND com o propósito de linearizá-los. Os dados de solubilidade do colágeno de resíduo de CMS de frango em função da variação do pH foram ajustados por função empírica sigmoidal (logística), conforme o modelo estatístico:

$$Y_i = \alpha + \frac{(\beta - \alpha)}{1 + e^{-k(\gamma - \delta)}} + \varepsilon_i$$

em que,  $Y_i$  = solubilidade do colágeno (%) na  $i$ -ésima repetição sob o pH  $\gamma$ ;  $\alpha$  = solubilidade final (%) na linha de base pós-transição (*post-transition baseline*) ou fase assintótica/estacionária/estado estável (*plateau phase/stationary phase/steady state*), quando  $\gamma \rightarrow \infty$ ;  $\beta$  = solubilidade inicial (%) na linha de base pré-transição (*pre-transition baseline*) ou fase de latência (*lag phase*);  $e$  = exponencial;  $k$  = taxa de alteração na solubilidade;  $\gamma$  = valor de pH (1 a 10);  $\delta$  = ponto no pH em que a solubilidade alcança 50% da amplitude da

zona de transição (*transition zone*), ponto médio (*midpoint*) ou ponto de inflexão (*inflection point*);  $\varepsilon_i$  = erro experimental associado a cada observação, pressuposto  $\varepsilon_i \stackrel{iid}{\sim} N(0, \sigma^2)$ . Os parâmetros do modelo foram estimados pelo algoritmo de Gauss-Newton modificado com o procedimento NLIN do SAS<sup>®</sup>. O coeficiente de determinação ( $r^2$ ) do modelo de regressão foi expresso em relação à fonte tratamentos (regressão + falta de ajuste). As análises estatísticas foram realizadas no aplicativo SAS<sup>®</sup> *System for Windows*<sup>™</sup> versão 9.4 (SAS Institute Inc., Cary - NC, USA), ao nível de 5% de significância.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

### *Caracterização da matéria-prima*

Os resultados da composição centesimal do resíduo de CMS de frango integral e pré-tratado estão apresentados na Tabela 1. Observou-se elevado teor de proteínas no resíduo de CMS de frango *in natura* (44,94% em base seca) que se deve provavelmente a carne remanescente e a grande quantidade de cartilagens presentes. O elevado teor de hidroxiprolina (6,22% em base seca) indica um alto teor de colágeno no resíduo, tornando-o uma alternativa promissora para obtenção de colágenos e hidrolisados proteicos. O resíduo de CMS também apresenta alto conteúdo de cinzas (41,20% em base seca), sendo o cálcio correspondente a aproximadamente 45% das cinzas.

O resíduo apresentou pH elevado, 7,78 ( $\pm 0,03$ ). Esse pH próximo a neutralidade favorece o desenvolvimento de diversas bactérias, o que torna o resíduo, assim como a CMS de frango, bastante perecível, se fazendo necessário o armazenamento sob congelamento e o rápido processamento.

De acordo com a Tabela 1, é possível verificar que o pré-tratamento foi eficiente uma vez que se conseguiu diminuir os níveis de cinzas e lipídeos, tornando a proteína o principal constituinte do resíduo pré-tratado, 84,19% em base seca.

### ***Rendimento***

O resíduo de CMS de frango apresentou baixa solubilidade em ácido acético (dados não apresentados), no entanto foi solubilizado com maior facilidade na extração com pepsina. O rendimento do colágeno solubilizado com pepsina foi de 13,00% ( $\pm 0,88$ ) em base seca ou 5,80% ( $\pm 0,39$ ) em base úmida. Kaewdang et al. (2014) obtiveram resultado semelhante para o colágeno de bexigas natatórias de atum (*Thunnus albacares*), em que a extração ácida apresentou rendimento bastante inferior (1,07%) quando comparada à extração com pepsina (12,10%).

O rendimento do colágeno de resíduo de CMS de frango foi inferior ao encontrado para colágeno de pés de frango obtido com pepsina 0,1% por 24 horas, 22,94% em peso seco (Hashim et al., 2014), entretanto foi superior ao obtido para alguns resíduos de pescado, tais como escama de carpa prata (*Hypophthalmichthys molitrix*) (2,32% em peso úmido) (Zhang et al., 2010) e pele de rohu (*Labeo rohita*) (6,8% em peso seco) (Sayedboworn et al., 2016).

A baixa solubilidade dos colágenos pode ser explicada pelo fato de que suas moléculas apresentam muitas reticulações inter-cadeias na região telopeptídica, resultando em baixa solubilidade em ácido (Zhang et al., 2007). No entanto, na presença da pepsina, as moléculas reticuladas na região telopeptídica são clivadas, resultando num aumento do rendimento de extração (Nagai et al., 2015).

O resíduo de CMS de frango apresentou em torno de 21,36 g de colágeno/100 g, com base no teor de hidroxiprolina, portanto, o rendimento baseado no teor inicial de colágeno ou a porcentagem de recuperação de colágeno foi de 27,14%.

## ***Caracterização do colágeno***

***Composição centesimal*** A composição centesimal do colágeno de resíduo de CMS de frango está apresentada na Tabela 2. Como esperado, a proteína foi o principal constituinte, 81,22%, porém valores ligeiramente superiores foram encontrados por Prestes et al. (2013) para fibra de colágeno (97,39%), gelatina (84,49%) e colágeno hidrolisado (87,35%) de bovinos.

O teor de umidade encontrado foi próximo ao obtido para gelatina de pele de African Catfish (*Clarias gariepinus*), 12,4% (Alfaro et al., 2014). O valor de lipídeos foi semelhante ao da fibra de colágeno bovino, 1,44% (Prestes et al., 2013). O teor de cinzas do colágeno de resíduo de CMS de frango foi elevado, 3,75%, porém próximo ao apresentado para o colágeno de pele de frango, 3,86% (Oechsle et al., 2016).

***Perfil de aminoácidos*** A Tabela 3 apresenta a composição de aminoácidos do colágeno de resíduo de CMS de frango. Verificou-se que a glicina é o aminoácido mais abundante (221,39 resíduos/1000 resíduos). A glicina é o menor aminoácido, geralmente é encontrado a cada três posições na cadeia polipeptídica, contribui na formação da tripla hélice do colágeno, permitindo que as três cadeias  $\alpha$ -helicoidais se encaixem firmemente em conjunto (Baynes and Dominiczak, 2015). O colágeno também contém grandes quantidades de prolina, ácido glutâmico e alanina. Este resultado está de acordo com o perfil de aminoácidos apresentado pelo colágeno de pele de pés de frango (Zhou et al., 2016) e colágeno de bexiga natatória de atum (*Thunnus albacares*) (Kaewdang et al., 2014).

Sabe-se que o teor de iminoácidos (prolina e hidroxiprolina) desempenha um papel importante na estabilidade dos colágenos, uma vez que a prolina contribui para a formação da



estrutura primária do peptídeo e estabilização da estrutura terciária do colágeno, enquanto a hidroxiprolina auxilia na formação de ligações de hidrogênio através do grupo OH (Veeruraj et al., 2015; Zhou et al. 2016).

O colágeno de resíduo de CMS de frango apresentou teor de iminoácido de 20,2%, teor próximo ao encontrado por Nagai et al. (2015) para pele de Ema (21,8%) e superior ao obtido por Zhang et al. (2007) para pele de carpa capim (18,6%). Colágenos de mamíferos geralmente apresentam teores de iminoácidos mais elevados, 23,3% para bovino (Sarbon et al., 2013) e 22,0% para suíno (Li et al., 2013), o que justifica sua maior estabilidade térmica quando comparados aos colágenos de aves e peixes.

***Espectroscopia de Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR)*** Os principais picos do espectro de infravermelho do colágeno de resíduo de CMS de frango estão apresentados na Figura 1a e a atribuição correspondente dos picos estão na Tabela 4. Como era esperado o colágeno de resíduo de CMS exibiu espectro de FTIR semelhante aos encontrados para o colágeno de pele de pés de frango (Zhou et al., 2016) e colágeno de pés de frango (Hashim et al., 2014), com picos de absorção característicos, situados nas regiões das bandas das amidas A e B e I, II e III.

A banda de amida A foi encontrada em número de onda de  $3325\text{ cm}^{-1}$ , de acordo com Doyle et al. (1975) uma vibração de estiramento livre de NH ocorre na gama de  $3400\text{-}3440\text{ cm}^{-1}$  e quando o grupo NH de um peptídeo está envolvido numa ligação de hidrogênio, a posição é deslocada para frequências mais baixas, geralmente em torno de  $3300\text{ cm}^{-1}$ . O que indica que alguns grupos NH do colágeno estão envolvidos em ligações de hidrogênio. A banda de amida B do colágeno ( $2924\text{ cm}^{-1}$ ) está relacionada com o alongamento assimétrico da vibração de estiramento de  $\text{CH}_2$  (Abe and Krimm, 1972).

A banda de amida I ( $1658\text{ cm}^{-1}$ ), com frequências características na gama de  $1600$  a  $1700\text{ cm}^{-1}$ , foi associada principalmente às vibrações de estiramento dos grupos carbonila ao longo do esqueleto polipeptídico (Payne and Veis, 1988). A banda de amida II estava situada a um número de onda de  $1556\text{ cm}^{-1}$ , enquanto a banda de amida III estava em  $1240\text{ cm}^{-1}$ . As bandas amida II e III representam vibrações de flexão N-H acopladas com vibração de estiramento C-N (Payne and Veis, 1988; Jackson et al., 1995).

O colágeno apresentou absorção a  $1080\text{ cm}^{-1}$ , decorrente da vibração de estiramento C-O das porções carboidratos ligadas à proteína (Petibois et al., 2006), sugerindo que o colágeno pode conter carboidratos ligados a resíduos de hidroxilisina da cadeia polipeptídica (proteoglicanos).

A razão obtida entre a área do pico da amida III e do pico em  $1454\text{ cm}^{-1}$  para o colágeno de resíduo de CMS foi de 0,97, de acordo com Plepis et al. (1996) geralmente uma razão de aproximadamente 1,0 revela a estrutura tripla helicoidal de colágenos. Comprovando que a estrutura de tripla hélice não foi afetada pela pepsina durante o processo de extração do colágeno.

Um método matemático foi aplicado ao espectro de FTIR do colágeno de resíduo de CMS para aumentar sua resolução, através do uso da derivação (Figura 1b). Esse método de aumento de resolução se baseia na separação dos picos que compõem as bandas e na correlação de suas áreas ou intensidades com as estruturas (Forato et al., 1998).

***Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC)*** O aquecimento do colágeno resulta em transformações irreversíveis, ocorre a quebra de ligações de hidrogênio entre as cadeias polipeptídicas e com isso a estrutura de tripla hélice de colágeno se transforma em uma estrutura aleatória enrolada. A temperatura no ponto médio deste processo é conhecida como

temperatura de desnaturação proteica,  $T_m$  (Wright and Humphrey, 2002; Voet and Voet, 2013). A  $T_m$  é um índice útil para avaliar a estabilidade de colágeno.

A Figura 2 apresenta o termograma por DSC para o colágeno de resíduo de CMS de frango extraído com pepsina. Observou-se uma transição endotérmica em temperatura de 46,47 °C, correspondente à desnaturação do colágeno, o processo apresentou entalpia de 27,87 J/g. Em estudo de Hashim et al. (2014), o colágeno de pés de frango apresentou temperatura de desnaturação de 48,60 °C.

A temperatura de desnaturação do colágeno de resíduo de CMS de frango foi inferior a de colágeno da pele de suínos e bovinos, que de acordo com Zhao and Chi (2009), está entre 60 e 65 °C. No entanto, o colágeno obtido do resíduo de CMS de frango se mostrou mais estável ao calor que a maioria dos colágenos obtidos de pescados, que são os mais utilizados e estudados em substituição ao colágeno de mamíferos, como da pele de Amur esturjão (32,46 °C) (Wang et al. 2014), pele de Bacalhau Báltico (15,2 °C), Salmão (20,6 °C) e Catfish africano (29,3 °C) (Tylingo et al., 2016) e das cartilagens de tubarão (*Chiloscyllium punctatum* e *Carcharhinus limbatus*) (35,98 e 34,56 °C) (Kittiphattanabawon et al., 2010). Também apresentou maior temperatura de desnaturação que o colágeno de pele de Ema, 31,5 °C (Nagai et al, 2015).

Desta forma o colágeno de resíduo de CMS de frango apresenta uma vantagem em relação a alguns colágenos de peixes, devido a sua maior estabilidade térmica este colágeno apresenta maior gama de aplicações em processos industriais.

A estabilidade térmica do colágeno está relacionada à sua estrutura química, a presença de aminoácidos, particularmente a hidroxiprolina e prolina, contribuindo para a estabilidade da tripla hélice através das ligações de hidrogênio entre as cadeias  $\alpha$  (Kaewdang et al., 2014; Wang et al., 2014).

**Análise de Eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE)** A Figura 3 apresenta o SDS-PAGE do colágeno de resíduo de CMS de frango, utilizando gel a 15%. Pode-se observar duas bandas distintas, próximo a 125 kDa, correspondentes à duas cadeias  $\alpha$ ,  $\alpha_1$  e  $\alpha_2$ . Este resultado indica que o colágeno é constituído principalmente por colágeno do tipo I, o qual é composto por duas cadeia  $\alpha_1$  e uma cadeia  $\alpha_2$ , e é encontrado principalmente na pele, ossos, tendões, vaso sanguíneo e córneas (Damodaran et al., 2010).

Alguns estudos mostraram que o colágeno de aves é composto por cadeias  $\alpha$ , pelo menos  $\alpha_1(I)$  e  $\alpha_2(I)$  e cadeia  $\beta$  assim como os colágeno de mamíferos (Nagai et al., 2015; Kuan et al., 2017), no entanto, na SDS-PAGE do colágeno de resíduo de CMS a banda  $\beta$  não foi identificada, além disso, foi possível verificar algumas proteínas de menor peso molecular, entre 100 e 30 kDa.

De acordo com Nagai et al. (2015) a extração com pepsina pode acarretar em clivagem do componente  $\beta$  em componentes  $\alpha$ . Em estudo de Oechsle et al. (2016) o colágeno do osso de galinha apresentou apenas colágeno do tipo I, indicado por cadeias  $\alpha_1 (I)$  e  $\alpha_2 (I)$ .

### ***Avaliação das propriedades funcionais do colágeno***

O colágeno apresenta diversas aplicações industriais, devido a sua capacidade de atuar como agente de ligação e gelificação, substituto de gordura, agente de efeitos de superfície, como emulsionante e formador de espumas, entre outras características (Gómez-Guillén et al., 2011). De acordo com a aplicação que será dada ao colágeno, diferentes características são necessárias, por isso a avaliação das propriedades funcionais do colágeno faz-se necessária.

**Solubilidade** A Figura 4 apresenta a solubilidade relativa observada e estimada para o colágeno de resíduo de CMS de frango em função do pH. Os dados foram ajustados por função empírica sigmoideal, a equação da curva de solubilidade estimada mostrou solubilidade

inical ou máxima em pH 1, 95,8316%, e solubilidade final (pH 10) de 25,0448%. O ponto de inflexção, onde a solubilidade alcança 50% ocorreu em pH 5,1493, e a taxa de alteração da solubilidade foi de -1,2339.

A solubilidade observada mais elevada foi obtida em pH 2,0. De modo geral, o colágeno apresentou maior solubilidade em pH ácido, de 1,0 a 4,0. Com o aumento do pH, de 4,0 a 7,0, observou-se redução acentuada na solubilidade, sendo a menor solubilidade observada encontrada em pH 7,0, em pH alcalino, 8,0 a 10,0, ocorreu um leve aumento da solubilidade observada.

Comportamento semelhante foi encontrado para o colágeno de pele de unicorn leatherjacket (*Aluterus monoceros*) (Ahmad et al., 2010) e colágeno de pele e bexiga natatória de carpa capim (*Ctenopharyngodon idella*) (Wu et al., 2016). Munasinghe et al. (2015) avaliaram a solubilidade do colágeno de pele de frango extraído com pepsina, em pH 2,0, 4,0, 6,0, 8,0 e 10,0, e os resultados foram semelhantes aos obtidos para o colágeno de resíduo de CMS de frango, a maior solubilidade ocorreu em pH 2,0, e a menor foi encontrada em pH 8,0.

A variação na solubilidade de proteínas com o pH pode ser devido a diferenças no ponto isoelétrico (pI). No pI a carga líquida total das moléculas de proteína é zero, resultando na precipitação da proteína. Em contrapartida, à medida que o pH é inferior ou superior ao pI, a solubilidade é aumentada pelas forças de repulsão entre os resíduos carregados de moléculas de proteína (Lin et al., 2002; Damoradan et al., 2010).

**Propriedades da Espuma** Na Tabela 5 estão expostos os resultados de capacidade de formação de espuma (CFE) e estabilidade da espuma (EE) do colágeno de resíduo de CMS de frango. Observou-se que a CFE aumentou significativamente com o incremento da concentração de colágeno, de 0,25 a 1%. De acordo com Zeng et al. (2013) isso se deve a maior concentração de proteínas migrando para a superfície das bolhas de ar, levando a

formação mais rápida e a maior estabilidade da espuma. Resultado semelhante foi encontrado por Giménez et al. (2009), para hidrolisados de gelatina de pele de linguado e lula, onde a CFE aumentou de cerca de 6-7% para 32-34% quando a concentração aumentou de 0,5% para 2%.

Na estabilidade da espuma observou-se efeito significativo ( $p < 0,05$ ) para ambas variáveis, concentração de colágeno (0,25, 0,5 e 1,0%) e tempo (1, 10, 30 e 60 minutos). Ao longo dos 60 minutos de monitoramento houve uma diminuição na estabilidade da espuma. De maneira geral, foi verificado um aumento na estabilidade da espuma com o aumento da concentração de colágeno, que foi significativo nos tempos de 30 e 60 minutos.

Segundo Zayas (1997) espumas com maiores concentrações de proteínas são mais densas e mais estáveis, devido a um aumento na espessura de filmes interfaciais. Além disso, as propriedades espumantes da proteína podem ser influenciadas pela fonte, propriedades intrínsecas, composição e conformação da proteína. De acordo com Lassoued et al. (2014) moléculas de proteína com elevado peso molecular podem formar películas mais resistentes levando a uma maior estabilidade da espuma.

**Propriedades emulsificantes** O colágeno de resíduo de CMS de frango (0,1%) apresentou índice de atividade emulsificante (EAI) de 49,27 m<sup>2</sup>/g ( $\pm 0,84$ ), superior ao da gelatina de ossos bovino (1%), 28,27 m<sup>2</sup>/g (Aewsiri et al., 2009) e gelatina de pele bovina (1%) 27,02 m<sup>2</sup>/g e pele de Grey triggerfish 21,44 m<sup>2</sup>/g (Jellouli et al., 2011).

No entanto o colágeno de resíduo de CMS exibiu menor índice de estabilidade da emulsão (ESI), 13,26 min ( $\pm 0,68$ ), que as gelatinas de ossos e pele bovina (31,23 e 39,77 min) (Aewsiri et al., 2009; Jellouli et al., 2011). Mas foi semelhante ao obtido para gelatina de pele de splendid squid (*Loligo formosana*) (1%), extraída em diferentes temperaturas (50, 60, 70 e 80 °C), 14,46 a 12,67 min (Nagarajan et al., 2012).

Quanto maior a solubilidade da proteína mais elevada a eficiência do emulsionante, isso porque as moléculas solubilizadas de proteína são capazes de migrar para a superfície das gotículas de gordura rapidamente (Zayas, 1997).

**Digestibilidade *in vitro*** O colágeno de resíduo de CMS de frango extraído com pepsina apresentou baixa digestibilidade *in vitro*, 29,86% ( $\pm$  2,14), quando comparada a outras proteínas como a albumina (98,3%) (Costa et al., 2007) e a caseína (93,82%) (Neves et al., 2006). A baixa digestibilidade obtida para o colágeno pode ser decorrente do uso da enzima pepsina para simular a digestão, sendo que esta mesma enzima já havia sido utilizada na etapa de extração do colágeno.

Zhou et al. (2016) realizaram a digestão gastrointestinal simulada de colágeno de pele de pés de frango, ao final do processo o grau de hidrólise obtido para o colágeno extraído com pepsina foi de 24,00%, superior ao dos colágenos extraídos com sal e ácido. Este resultado foi atribuído a maior clivagem nas moléculas de colágeno extraído com pepsina.

**Viscosidade** A viscosidade de uma solução de colágeno de resíduo de CMS de frango 0,03% (p/v), em ácido acético 0,1 M, foi avaliada a 10, 25 e 50 °C e variou entre 14,57 e 8,80 cP (Tabela 6). Os resultados obtidos foram próximos aos encontrados para colágenos de escama de tilápia (*Oreochromis sp.*), que variaram de 8,1 a 10,2 cP, para soluções 6,67% a 60 °C (Huang et al., 2016).

Observou-se uma diminuição significativa na viscosidade da solução em função do aumento da temperatura. Segundo Usha e Ramasami (2004) a elevação da temperatura ocasiona a quebra gradual das ligações de hidrogênio do colágeno. Conseqüentemente, a estrutura de tripla hélice é convertida em uma conformação aleatória, causando alterações nas propriedades físicas do colágeno, como viscosidade, sedimentação, difusão, dispersão de luz e

atividade óptica. De acordo com o termograma por DSC (Figura 2) esse processo começa a ocorrer em torno dos 46,5 °C para o colágeno de resíduo de CMS de frango.

## CONCLUSÃO

O colágeno de resíduo de CMS de frango exibiu rendimento de 13,00% em base seca e elevada estabilidade térmica, com temperatura de desnaturação em torno de 46,5°C.

O colágeno obtido apresentou características semelhantes a outros colágenos, como a composição de aminoácidos, com predomínio de glicina e prolina, o espectro FTIR, com banda das amidas A e B e I, II e III e a solubilidade elevada em pH ácido. Além disso, mostrou índice de atividade emulsificante (49,27 m<sup>2</sup>/g) superior a gelatinas convencionais. Através da análise de SDS-PAGE foi determinado que o colágeno é constituído principalmente por colágeno do tipo I.

Diante disso, o resíduo de CMS de frango comprovou ser uma fonte tecnologicamente viável para extração de colágeno e, o colágeno deste resíduo se mostrou promissor como alternativa aos colágenos de mamíferos e com potencial de aplicação industrial, tornando possível a agregação de valor aos resíduos gerados na elaboração da CMS de frango.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Abe, Y., and S. Krimm. 1972. Normal vibrations of crystalline polyglycine I. Biopolym: Orig. Res. Biomol. 11:1817-1839.

ABPA. Associação Brasileira de Proteína Animal. Relatório Anual 2017. Retrieved on February 14, 2018, from ABPA Website: [http://abpa-br.com.br/storage/files/3678c\\_final\\_abpa\\_relatorio\\_anual\\_2016\\_portugues\\_web\\_reduzido.pdf](http://abpa-br.com.br/storage/files/3678c_final_abpa_relatorio_anual_2016_portugues_web_reduzido.pdf)



Aewsiri, T., S. Benjakul, and W. Visessanguan. 2009. Functional properties of gelatin from cuttlefish (*Sepia pharaonis*) skin as affected by bleaching using hydrogen peroxide. *Food Chem.* 115:243-249.

Ahmad, M., S. Benjakul, and S. Nalinanon. 2010. Compositional and physicochemical characteristics of acid solubilized collagen extracted from the skin of unicorn leatherjacket (*Aluterus monoceros*). *Food Hydrocoll.* 24:588-594.

Alfaro, A. T., F. C. Biluca, C. Marquetti, I. B. Tonial, and N. E. De Souza. 2014. African catfish (*Clarias gariepinus*) skin gelatin: Extraction optimization and physical-chemical properties. *Food Res. Int.* 65:416-422.

Baynes, J., and M. H. Dominiczak. 2015 *Bioquímica Médica*. Elsevier Brasil, 4ª edição, 664 p.

Costa, P.G, A. Fontana, and I. Veiga. 2007. Caracterização funcional e nutricional de um isolado proteico obtido a partir de resíduos de camarão rosa. *Aliment Nutr* 18:7-18.

Damodaran S., K. Parkin, and O. R. Fennema. 2010. *Química de Alimentos de Fennema*. Artmed, Porto Alegre, 900 p.

Doyle, B. B., E. G. Bendit, and E. R. Blout. 1975. Infrared spectroscopy of collagen and collagen-like polypeptides. *Biopolym.* 14:937-957.

Duan, R., J. J. Zhang, X. Q. Du, X. C. Yao, and K. Konno. 2009. Properties of collagen from skin, scale and bone of carp (*Cyprinus carpio*). *Food Chem.* 112:702-706.

Ferro, P. U.S. and A. M. Ham. 1957. Colorimetric determination of calcium by chloranilic acid. II: A semimicro method with reduced precipitation time. *Am. J. Clin. Pathol.* 28:689-692.

Forato, L. A., R. Bernardes Filho, and L. A. Colnago. 1998. Estudo de métodos de aumento de resolução de espectros de FTIR para análise de estruturas secundárias de proteínas. *Quím. Nova* 21:146-150.

Giménez, B., A. Alemán, P. Montero, and M. C. Gómez-Guillén. 2009. Antioxidant and functional properties of gelatin hydrolysates obtained from skin of sole and squid. *Food Chem.* 114:976-983.

Gómez-Guillén, M. C., B. Giménez, M. E. López-Caballero, and M. P. Montero. 2011. Functional and bioactive properties of collagen and gelatin from alternative sources: A review. *Food Hydrocoll.* 25:1813-1827.

Hashim, P., M. S. M. Ridzwan, and J. Bakar. 2014. Isolation and characterization of collagen from chicken feet. *Int. J. Biol. Vet. Agric. Food Eng.* 8:242-246.

Huang, C.Y., J. M. Kuo, S. J. Wu, and H. T. Tsai. 2016. Isolation and characterization of fish scale collagen from tilapia (*Oreochromis* sp.) by a novel extrusion–hydro-extraction process. *Food Chem.* 190:997-1006.

Instituto Adolfo Lutz. 2008. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Métodos Físico-Químicos para Análises de Alimentos, Ministério da Saúde, Agência Nacional de Vigilância Sanitária, Brasília, Ministério da Saúde, 1018p.

Jackson, M., P. H. Watson, W. C. Halliday, and H. H. Mantsch. 1995. Beware of connective tissue proteins: assignment and implications of collagen absorptions in infrared spectra of human tissues. *Biochim. et Biophys. Acta* 1270:1-6.

Jeevithan, E. W. Wu, W. Nanping, H. Lan, and B. Bao. 2014. Isolation, purification and characterization of pepsin soluble collagen isolated from silvertip shark (*Carcharhinus albimarginatus*) skeletal and head bone. *Process Biochem.* 49:1767-1777.

Jellouli, K., R. Balti, A. Bougatef, N. Hmidet, A. Barkia, and Nasri, M. 2011. Chemical composition and characteristics of skin gelatin from grey triggerfish (*Balistes capriscus*). *LWT-Food Scie Technol.* 44:1965-1970.

Kaewdang, O., S. Benjakul, T. Kaewmanee, and H. Kishimura. 2014. Characteristics of collagens from the swim bladders of yellowfin tuna (*Thunnus albacares*). Food Chem. 155:264-270.

Kuan, Y. H., A. M. Nafchi, N. Huda, F. Ariffin, and A. A. Karim. 2017. Comparison of physicochemical and functional properties of duck feet and bovine gelatins. J. Sci. Food Agric. 97:1663-1671.

Kim, S.E., and E. Mendis. 2006. Bioactive compounds from marine processing byproducts – a review. Food Res. Int. 39:383-393.

Kittiphattanabawon, P., S. Benjakul, W. Visessanguan, and F. Shahidi. 2010. Isolation and characterization of collagen from the cartilages of brownbanded bamboo shark (*Chiloscyllium punctatum*) and blacktip shark (*Carcharhinus limbatus*). LWT-Food Sci. Technol. 43:792-800.

Kittiphattanabawon, P., S. Benjakul, W. Visessanguan, T. Nagai, and M. Tanaka. 2005. Characterisation of acid-soluble collagen from skin and bone of bigeye snapper (*Priacanthus tayenus*). Food Chem. 89: 363-372.

Laemmli, U. K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature 22:680-685.

LAMIC - Laboratório de Análises Micotoxicológicas. Metodologias do LAMIC. 2017. Santa Maria: Universidade Federal de Santa Maria. Retrieved on July 07, 2017, from LAMIC Website: <http://www.lamic.ufsm.br/web/>

Lassoued, I., M. Jridi, R. Nasri, A. Dammak, M. Hajji, M. Nasri, and A. Barkia. 2014. Characteristics and functional properties of gelatin from thornback ray skin obtained by pepsin-aided process in comparison with commercial halal bovine gelatin. Food Hydrocoll. 41:309-318.

Li, Z. R., B. Wang, C. F. Chi, Q. R. Zhang, Y. D. Gong, J. J. Tang, H. Y. Luo, and G. F. Ding. 2013. Isolation and characterization of acid soluble collagens and pepsin soluble collagens from the skin and bone of Spanish mackerel (*Scomberomorus niphonius*). Food Hydrocoll. 31:103-113.

Lin, W., L. Yan, C. Mu, W. Li, M. Zhang, and Q. Zhu. 2002. Effect of pH on gelatin self-association investigated by laser light scattering and atomic force microscopy. 2002. Polym Int. 51:233-238.

Lowry, O. H., N. J. Rosebrough, A. L. Farr, and R. J. Randall. 1951. Protein measurement with Folin phenol reagent. J. Biol. Chem. 193:256–275.

Montero, P., F. Jimenez-Colmenero, and J. Borderias. 1991. Effect of pH and the presence of NaCl on some hydration properties of collagenous material from trout (*Salmo gairdneri*) muscle and skin. J. Sci. Food Agric. 54:137–146.

Munasinghe, K. A., J. G. Schwarz, and M. Whittiker. 2015. Utilization of chicken by-products to form collagen films. J. Food Process. 2015:1-6.

Nagai, T., Y. Tanoue, N. Kai, and N. Suzuki. 2015. Characterization of collagen from emu (*Dromaius novaehollandiae*) skins. J. Food Sci. Technol. 52:2344-2351.

Nagarajan, M., S. Benjakul, T. Prodpran, P. Songtipya, and H. Kishimura. 2012. Characteristics and functional properties of gelatin from splendid squid (*Loligo formosana*) skin as affected by extraction temperatures. Food Hydrocoll. 29:389-397.

Negrão, C. C., I. Y. Mizubuti, M. C. Morita, C. Colli, E. I. Ida, and M. Shimokomaki. 2005. Biological evaluation of mechanically deboned chicken meat protein quality. Food Chem. 90:579-83.

Neves, V. A.; S. I. Silva, and M. A. Silva. 2006. Isolamento da globulina majoritária, digestibilidade in vivo e in vitro das proteínas do tremçoço-doce (*Lupinus albus L.*), var. multolupa. Ciênc. Tecnol. Alim. 26:832-840.

Oechsle, A. M., D. Akgün, F. Krause, C. Maier, M. Gibis, R. Kohlus, and J. Weiss. 2016. Microstructure and physical–chemical properties of chicken collagen. *Food Struct.* 7:29-37.

Payne, K. J., and A. Veis. 1988. Fourier transform IR spectroscopy of collagen and gelatin solutions: deconvolution of the amide I band for conformational studies. *Biopolym.* 27:1749-1760.

Pearce, K. N., and J. E. Kinsella. 1978. Emulsifying properties of proteins: Evaluation of a turbidimetric technique. *J. Agric. Food Chem.* 26:716-723.

Petibois, C., G. Gouspillou, K. Wehbe, J. P. Delage, and G. Déléris. 2006. Analysis of type I and IV collagens by FT-IR spectroscopy and imaging for a molecular investigation of skeletal muscle connective tissue. *Anal. and Bioanal Chem.* 386:1961-1966.

Plepis, A. M. D. G., G. Goissis, and D. K. Das-Gupta. 1996. Dielectric and pyroelectric characterization of anionic and native collagen. *Polym Eng Sci.* 36:2932-2938.

Prestes, R. C., S. M. Golunski, G. Toniazzi, A. P. Kempka; and M. Diluccio. 2013. Caracterização da fibra de colágeno, gelatina e colágeno hidrolisado. *Rev. Bras. Prod. Agroind.* 15:375-82.

Sai, K. P., and M. Babu. 2001. Studies on *Rana tigerina* skin collagen. *Comp Biochem. Physiol. Part B: Biochem Mol. Biol.* 128:81-90.

Sarbon, N. M., F. Badii, and N. K. Howell. 2013. Preparation and characterisation of chicken skin gelatin as an alternative to mammalian gelatin. *Food Hydrocoll.* 30:143–151.

Savedboworn, W., P. Kittiphattanabawon, S. Benjakul, S. Sinthusamran, and H. Kishimura. 2016. Characteristics of collagen from rohu (*Labeo rohita*) skin. *J. Aquat. Food Prod. Technol.* 26:248-257.

Shahidi, F., X. Q. and J. Han. Synowiecki, J. 1995. Production and characteristics of protein hydrolysates from capelin (*Mallotus villosus*). *Food Chem.* 53:285-293.

Shimokomaki, M. 2005 Biological evaluation of mechanically deboned chicken meat protein quality. *Food Chem.* 90:579-583.

Sperotto, R. A. 2014. *Protocolos e métodos de análise em laboratórios de biotecnologia agroalimentar e de saúde humana*. Editora Univates, Lageado, 300p.

Tylingo, R., S. Mania, and A. Panek. 2016. Isolation and Characterization of Acid Soluble Collagen from the Skin of African Catfish (*Clarias gariepinus*), Salmon (*Salmo salar*) and Baltic Cod (*Gadus morhua*). *J. Biotechnol Biomater.* 6:1-6.

Usha, R., and T. Ramasami. 2004. The effects of urea and n-propanol on collagen denaturation: using DSC, circular dichroism and viscosity. *Thermochim Acta* 409:201-206.

Veeruraj, A., M. Arumugam, T. Ajithkumar, and T. Balasubramanian. 2015. Isolation and characterization of collagen from the outer skin of squid (*Doryteuthis singhalensis*). *Food Hydrocoll.* 43:708-716.

Voet, D., and J. G. Voet. 2013. *Bioquímica*. 4. ed. Porto Alegre: Artmed, 1512 p.

Wang, L. Q. Liang, Z. Wang, J. Xu, Y. Liu, and H. Ma. 2014. Characterization of collagen from the skin of Amur sturgeon (*Acipenser schrenckii*). *Food Hydrocoll.* 38:104-109.

Wright, N. T., and J. D. Humphrey. 2002. Denaturation of collagen via heating: an irreversible rate process. *Annu. Rev. Biomed. Eng.* 4:109-128.

Wu, X., L. Cai, A. Cao, Y. Wang, T. Li, and J. Li. 2016. Comparative study on acid-soluble and pepsin-soluble collagens from skin and swim bladder of grass carp (*Ctenopharyngodon idella*). *J. Sci. Food Agric.* 96:815-821.

Zayas, J. F. 1997. *Functionality of proteins in food*. Springer-Verlag/Harwood Academic Publishers, Berlin/UK. 373 p.

Zeng, Q. R., M. Zhang, B. P. Adhikari, and A. S. Mujumdar. 2013 Effect of drying processes on the functional properties of collagen peptides produced from chicken skin. *Dry. Technol.* 31:1653-1660.

Zhang, Y., W. Liu, G. Li, B. Shi, Y. Miao, and X. Wu. 2007. Isolation and partial characterization of pepsin-soluble collagen from the skin of grass carp (*Ctenopharyngodon idella*). *Food Chem.* 103:906-912.

Zhang, J., R. Duan, C. Ye, and K. Konno. 2010. Isolation and characterization of collagens from scale of silver carp (*Hypophthalmichthys molitrix*). *J. Food Biochem.* 34:1343-1354.

Zhao, Y. H., and Y. J. Chi. 2009. Characterization of collagen from eggshell membrane. *Biotechnol.* 8:254-258.

Zhou, C., Y. Li, X. Yu, H. Yang, H. Ma, A. E. A. Yagoub, Y. Cheng, J. Hu, and P. N. Y. Otu. 2016. Extraction and characterization of chicken feet soluble collagen. *LWT-Food Sci. Technol.* 74:145-153.

**Tabela 1** – Resultados obtidos para a composição centesimal do resíduo de CMS de frango e resíduo de CMS de frango pré-tratado em base úmida e base seca.

Constituintes	Resíduo de CMS		Resíduo de CMS pré-tratado	
	% base úmida	% base seca	% base úmida	% base seca
<b>Umidade</b>	55,40 ± 0,25	-	77,90 ± 0,28	-
<b>Proteína</b>	20,04 ± 0,87	44,94 ± 1,94	18,61 ± 0,28	84,19 ± 1,28
<b>Cinzas</b>	18,38 ± 0,73	41,20 ± 1,64	0,045 ± 0,01	0,20 ± 0,05
<b>Cálcio</b>	8,19 ± 0,38	18,36 ± 0,85	-	-
<b>Lipídeos</b>	3,81 ± 0,74	8,55 ± 1,65	1,18 ± 0,06	5,34 ± 0,27
<b>Hidroxiprolina</b>	2,67	6,22	*	*

Valores expressos em média ± desvio padrão, n=3.

\*Valor não determinado.

**Tabela 2** – Resultados obtidos para a composição centesimal do colágeno de resíduo de CMS de frango extraído com pepsina (g/100g de amostra).

Constituintes	g/100g (%)
<b>Umidade</b>	11,03 ± 0,57
<b>Proteína*</b>	81,22 ± 0,73
<b>Cinzas</b>	3,75 ± 0,11
<b>Lipídeos</b>	1,63 ± 0,07

\* O fator 5,5 foi aplicado para calcular a proteína a partir do teor de nitrogênio.

Valores expressos em média ± desvio padrão, n=3.



**Tabela 3** - Composições de aminoácidos do colágeno de resíduo de CMS de frango extraído com pepsina (resíduos/1000 resíduos).

<b>Aminoácido</b>	<b>Resíduos/1000</b>
Ácido aspártico (Asp)	61,25
Treonina (Thr)	19,48
Serina (Ser)	26,15
Ácido glutâmico (Glu)	110,90
Glicina (Gly)	221,39
Alanina (Ala)	96,88
Valina (Val)	22,68
Metionina (Met)	12,94
Isoleucina (Ile)	16,41
Leucina (Leu)	33,89
Tirosina (Tyr)	14,41
Fenilalanina (Phe)	26,42
Lisina (Lys)	31,62
Histidina (His)	16,28
Arginina (Arg)	61,78
Cistina (Cys)	25,22
Prolina (Pro)	136,78
Hidroxiprolina (Hyp)	65,52
Iminoácidos (Pro+Hyp)	202,30

**Tabela 4** – Principais picos do espectro de infravermelho com transformada de Fourier do colágeno de resíduo de CMS de frango extraído com pepsina.

<b>Região</b>	<b>Número de onda do pico (cm<sup>-1</sup>)</b>	<b>Atribuição</b>	<b>Referência</b>
Amida A	3325	Vibração de alongamento N-H acoplada com ligação H	Sai and Babu (2001)
Amida B	2924	Estiramento assimétrico de CH <sub>2</sub>	Abe and Krimm (1972)
-	2852	Alongamento assimétrico CH <sub>3</sub> principalmente proteína	Abe and Krimm (1972)
Amida I	1658	Alongamento C=O / ligação de hidrogênio acoplado com COO <sup>-</sup>	Payne and Veis (1988)
Amida II	1556	Flexão N-H acoplada com estiramento C-N	Jackson et al. (1995)
-	1454	Vibração de flexão CH <sub>2</sub>	Jackson et al. (1995)
-	1404	Estiramento simétrico COO <sup>-</sup>	Jackson et al. (1995)
-	1338	Balanço CH <sub>2</sub> (prolina)	Jackson et al. (1995)
Amida III	1240	Flexão N-H acoplada com estiramento C-N	Payne and Veis (1988)
-	1080	Vibração de estiramento C-O	Jackson et al. (1995)
-	875/667/617	Estiramento esquelético	Abe and Krimm (1972)

**Tabela 5** - Capacidade de formação de espuma (CFE) e estabilidade da espuma (EE) do colágeno de resíduo de CMS de frango extraído com pepsina.

Concent. (%)	CFE (%)	EE (%)				Média	ou	Equação
		1min	10min	30min	60min			
0,25	9,38 <sup>c</sup>	85,90	67,44	44,23	32,05	57,404 <sup>b</sup>		
0,5	12,67 <sup>b</sup>	92,86	62,14	41,07	35,36	57,857 <sup>b</sup>		
1,0	32,50 <sup>a</sup>	100,00	73,81	58,33	39,28	67,855 <sup>a</sup>		
<b>Média</b>		92,918 <sup>A</sup>	67,796 <sup>B</sup>	47,878 <sup>C</sup>	35,562 <sup>D</sup>			y=83,4962 - 0,8894x (r <sup>2</sup> = 0,86)

<sup>a</sup>Médias na mesma coluna com letras iguais sobrescritas não diferem significativamente entre si pelo teste de Tukey (P > 0,05).

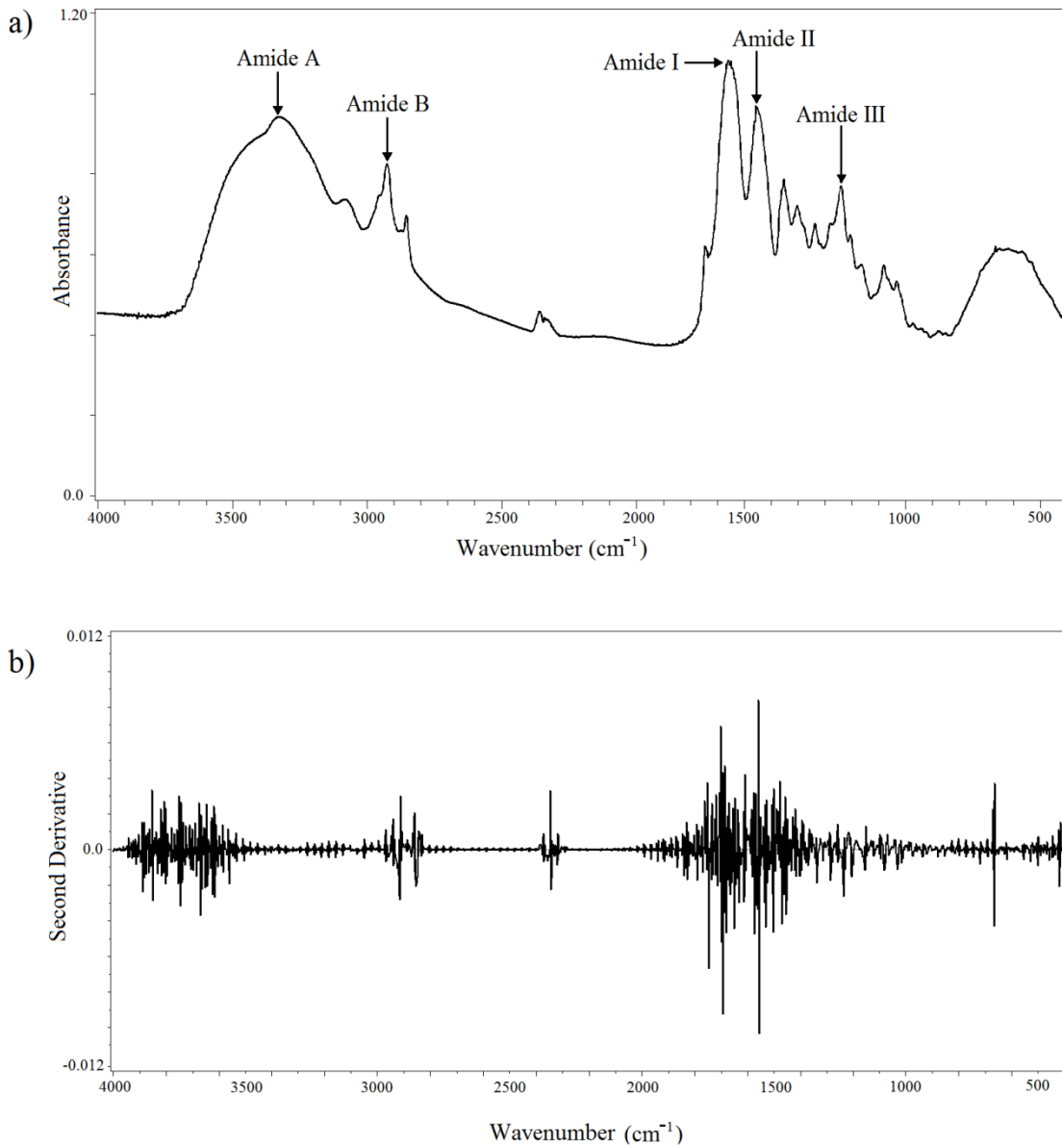
<sup>A</sup>Médias na mesma linha com letras iguais sobrescritas não diferem significativamente entre si pelo teste de Tukey (P > 0,05).

x= tempo (minutos); y= EE.

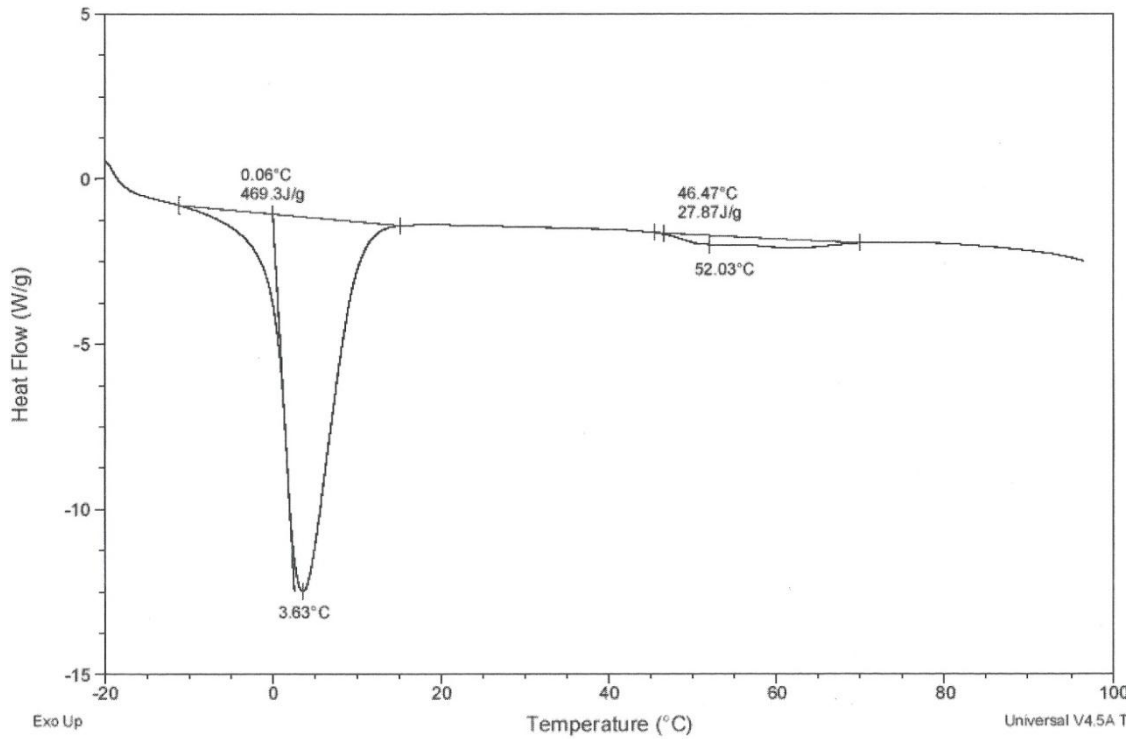
**Tabela 6** - Viscosidade da solução de colágeno de resíduo de CMS de frango extraído com pepsina.

Temperatura (°C)	Viscosidade (mPa.s ou cP)
10	14,57 <sup>a</sup> ± 0,53
25	12,03 <sup>b</sup> ± 0,34
50	8,80 <sup>c</sup> ± 0,57

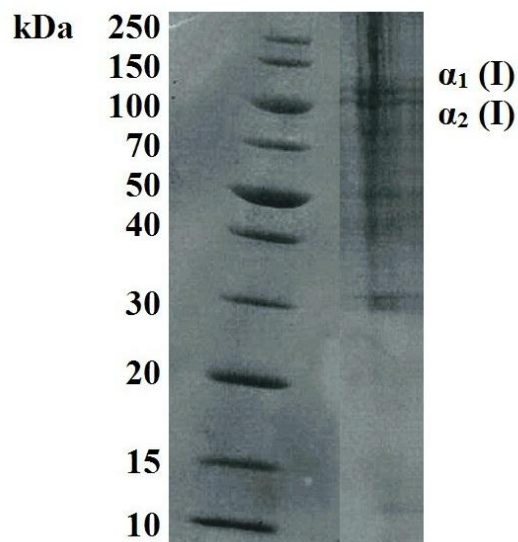
**Figura 1 – a)** Espectro de FTIR e **b)** segunda derivada do espectro do colágeno de resíduo de CMS de frango extraído com pepsina.



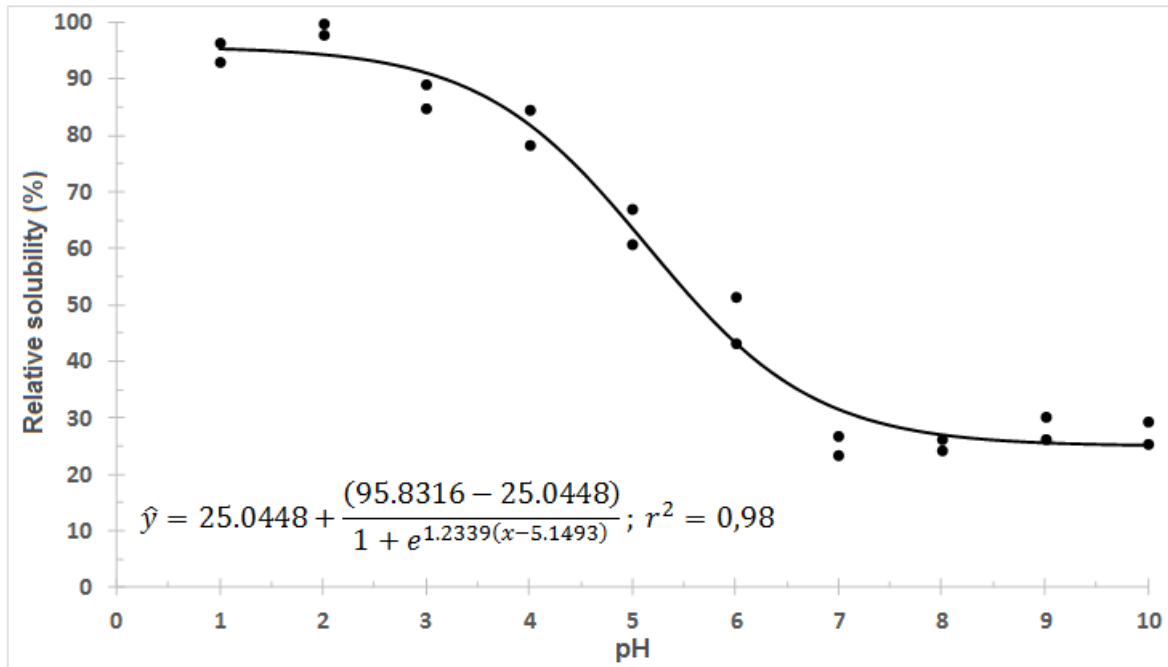
**Figura 2** – Termograma por DSC para o colágeno de resíduo de CMS de frango extraído com pepsina.



**Figura 3** - Eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) do colágeno de resíduo de CMS de frango extraído com pepsina.



**Figura 4** - Solubilidade relativa observada (%) (●) e estimada (—) do colágeno de resíduo de CMS de frango extraído com pepsina em função do pH



### **3.3. Manuscrito 3**

## **ULTRASSOM COMO MÉTODO ALTERNATIVO PARA AUMENTAR O RENDIMENTO DA EXTRAÇÃO DO COLÁGENO DE RESÍDUO DE CMS DE FRANGO**

**Artigo em fase final de revisão para ser submetido à Revista Ultrasonic Sonochemistry**  
(Formatado conforme as normas da revista)

# ULTRASSOM COMO MÉTODO ALTERNATIVO PARA AUMENTAR O RENDIMENTO DA EXTRAÇÃO DO COLÁGENO DE RESÍDUO DE CMS DE FRANGO

Michele M. Schmidt<sup>a\*</sup>, Alessandra R. Vidal<sup>b</sup>, Rosa C. P. Dornelles<sup>c</sup>, Ernesto H. Kubota<sup>d</sup>,  
Renius O. Mello<sup>e</sup>, Marcio A. Mazutti<sup>f</sup>, Rogério L. Cansian<sup>g</sup>

<sup>a</sup>Federal University of Santa Maria, Department of Science and Food Technology, Avenida Roraima, 1000, 97105-900, Camobi, Santa Maria RS, Brazil. mixi.schmidt@gmail.com

<sup>b</sup>Federal University of Santa Maria, Department of Science and Food Technology, Avenida Roraima, 1000, 97105-900, Camobi, Santa Maria RS, Brazil. alee.alessandra@yahoo.com.br

<sup>c</sup>Federal University of Santa Maria, Department of Science and Food Technology, Avenida Roraima, 1000, 97105-900, Camobi, Santa Maria RS, Brazil.  
rosacrisprestesdornelles@outlook.com

<sup>d</sup>Federal University of Santa Maria, Department of Science and Food Technology, Avenida Roraima, 1000, 97105-900, Camobi, Santa Maria RS, Brazil. ernehk2008@yahoo.com.br

<sup>e</sup>Federal University of Santa Maria, Department of Science and Food Technology, Avenida Roraima, 1000, 97105-900, Camobi, Santa Maria RS, Brazil. reniusmello@gmail.com

<sup>f</sup>Federal University of Santa Maria, Centre of Technology/Department of Chemical Engineering, Avenida Roraima, 1000, 97105-900, Santa Maria RS, Brazil.  
marciomazutti@gmail.com

<sup>g</sup>Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e das Missões, Departamento de Ciência e Tecnologia de Alimentos, Avenida Sete de Setembro, 1621, 99709-910, Erechim RS, Brasil.  
cansian@uricer.edu.br

\*Corresponding author: Michele M. Schmidt. Address: Rua Silva Jardim, nº 1892, apto 303, 97010-492, centro, Santa Maria, Rio Grande do Sul, Brazil, Tel: +55 55 91355181 e +55 55 33175181. E-mail: mixi.schmidt@gmail.com.



## **RESUMO**

O resíduo de carne mecanicamente separada (CMS) de frango é uma fonte potencial para extração de colágeno, para tanto, é necessário remover numerosas ligações cruzadas covalentes, o que torna o processo bastante complexo. O ultrassom tem sido empregado com sucesso na extração do colágeno, reduzindo o tempo de processo e aumentando o rendimento, no entanto, informações sobre os efeitos deste tratamento sobre as propriedades estruturais e funcionais das proteínas ainda são muito limitadas. Portanto, o objetivo deste estudo foi testar os efeitos do pré-tratamento com sonda ultrassônica e da extração enzimática com pepsina na obtenção do colágeno de resíduo de CMS de frango, e avaliar as propriedades dos colágenos obtidos através de eletroforese em gel (SDS-PAGE), espectroscopia de infravermelho de transformada de Fourier (FTIR), solubilidade e calorimetria exploratória diferencial (DSC). Tanto o ultrassom quanto a extração enzimática apresentaram efeito positivo sobre o rendimento de extração do colágeno de resíduo de CMS de frango sem afetar sua integridade, o que foi comprovado pelos espectros FTIR, e pela análise de eletroforese. A aplicação do ultrassom acarretou em aumento de rendimento de até 40%, quando comparados tratamentos que diferiram apenas pela aplicação do ultrassom. Todos os tratamentos exibiram elevada estabilidade térmica, de 43,91 e 46,96 °C, sendo os colágenos constituídos, principalmente, por colágeno do tipo I. O uso do ultrassom como pré-tratamento e a extração enzimática com pepsina foram eficazes em aumentar o rendimento de extração do colágeno de resíduo de CMS de frango, preservando a estrutura helicoidal tripla do colágeno nativo.

**Palavras-chave:** Eletroforese; Calorimetria Exploratória Diferencial; Espectroscopia de Infravermelho; Pepsina.

## **Highlights**

- Os colágenos obtidos são principalmente do tipo I, com elevada estabilidade térmica.
- O uso do ultrassom acarretou em 40% de aumento no rendimento de extração.
- O tempo de extração enzimática com pepsina teve efeito positivo sobre o rendimento.
- A integridade e funcionalidade dos colágenos não foram afetadas negativamente pelo uso do ultrassom e da pepsina;

## 1. Introdução

O colágeno é uma proteína fibrosa presente em quase todos os tecidos, incluindo a pele, ossos, vasos sanguíneos e tendões. Nos mamíferos é a mais abundante proteína corporal, responsável por 30% de todas as proteínas do corpo [1].

O colágeno é geralmente extraído de subprodutos do abate de bovinos, e é amplamente utilizado nas indústrias farmacêutica, cosmética, fotográfica e alimentícia [2,3]. No entanto, devido a ocorrência de doenças como a Encefalopatia Espongiforme Bovina (BSE) e a febre aftosa houve um aumento do interesse em colágenos alternativos [4]. O resíduo de CMS de frango pode ser uma fonte potencial para obtenção de colágeno, permitindo maior valorização deste resíduo, além disso, não foram encontrados na literatura estudos empregando o resíduo de CMS como matéria-prima para obtenção de colágeno.

Os métodos comumente empregados na extração do colágeno baseiam-se na sua solubilidade em soluções salinas neutras, soluções ácidas e no uso de proteases. Em comparação com os demais métodos, as proteases, principalmente a pepsina, tem resultado em maiores rendimentos [5-7]. Entretanto, estes métodos de extração convencionais são geralmente demorados e podem gerar grandes quantidades de resíduos.

Para a extração do colágeno, é necessário remover numerosas ligações cruzadas covalentes intra e intermoleculares, principalmente envolvendo resíduos de lisina e hidroxilisina, ligações éster e outras ligações com sacarídeos, o que torna o processo bastante complexo [8]. Além disso, o método de extração do colágeno pode influenciar no comprimento das cadeias polipeptídicas e nas suas propriedades funcionais [3].

O ultrassom tem sido empregado com sucesso na extração do colágeno, reduzindo o tempo de processo e aumentando o rendimento [8-10]. Os efeitos do ultrassom são principalmente devido ao fenômeno da cavitação [11], durante a sonicação bolhas de cavitação são rapidamente formadas, e sofrem um violento colapso, acarretando em temperaturas e pressões extremas. Isto leva ao cisalhamento e turbulência na zona de cavitação [12].

No entanto, informações sobre os efeitos do tratamento ultrassônico sobre as propriedades estruturais e funcionais das proteínas ainda são muito limitadas. De acordo com Ran & Wang [8] a aplicação do ultrassom durante um longo período de tempo, pode dar origem a temperaturas e força de cisalhamento elevadas e altas pressões no interior do meio. Também podem ocorrer quebra das ligações de hidrogênio e interações de van der Waals nas cadeias de polipeptídeos, levando a desnaturação da proteína.

O presente estudo teve como objetivo testar os efeitos do pré-tratamento com sonda ultrassônica e da extração enzimática com pepsina na obtenção do colágeno de resíduo de CMS de frango, e avaliar as propriedades dos colágenos extraídos através de análises de eletroforese em gel (SDS-PAGE), espectroscopia de infravermelho de transformada de Fourier (FTIR), solubilidade e calorimetria exploratória diferencial (DSC).

## **2. Material e métodos**

A matéria-prima congelada (resíduo do processo de extração de CMS de frango) foi doada pela Cooperativa Central Aurora (Aurora Alimentos) unidade de Erechim (RS), obtida em máquina High Tech, modelo HT-6.0 SS com capacidade de 6000 kg/h, potência de 50 CV, que pesa 1680 kg. O resíduo de CMS foi mantido sob congelamento em freezer (Metalfrio, VF50F) a -22 °C.

### **2.1. Obtenção do colágeno**

#### **2.1.1. Pré-tratamento**

O pré-tratamento do resíduo de CMS de frango foi realizado de acordo com metodologia de Li et al. [5] e Duan et al. [14] com algumas modificações. Inicialmente as proteínas não colagenosas foram removidas com solução de hidróxido de sódio (NaOH) 0,1M por 48 horas, com razão amostra/solução alcalina 1:20 (p/v), com troca da solução a cada 12 horas. Para descalcificação foi utilizada solução de EDTA-2Na 0,5 M (pH 7,5) por 5 dias, com razão amostra/solução 1:10 (p/v). A gordura foi extraída com álcool butílico 10% por 48 horas, com razão sólido/solvente de 1:10 (p/v), com troca do solvente a cada 12 horas. Todos os processos foram realizados sob agitação em Incubadora Shaker (Solab SL-223, Piracicaba, Brasil) a 150 rpm e 4 °C.

Após o pré-tratamento as amostras foram armazenadas sob congelamento em freezer (Metalfrio, VF50F) a -22 °C.

#### **2.1.2. Extração**

Para extração do colágeno de resíduo de CMS de frango foi seguida metodologia de Ran & Wang [8] com modificações nos tempo de pré-tratamento ultrassônico e de extração enzimática. Foi empregando um planejamento fatorial  $2^2$  com ponto central, utilizando como variáveis independentes: tempo de pré-tratamento com ultrassom (0, 15 e 30 minutos) e

tempo de extração enzimática com pepsina (24, 36 e 48 horas), conforme a Tabela 1. As extrações foram realizadas em duplicata (N=10).

O pré-tratamento com ultrassom foi realizado em água, com razão sólido/solvente de 1:15 (p/v), em copo encamisado ligado a banho ultratermostatizado (Solab SL-152/10, Piracicaba, Brasil) para controle da temperatura (4 °C), foi utilizada uma sonda ultrassônica Hielscher, UP200S (Ringwood, Alemanha), na sua potência (400 W) e frequência (24 KHz) máximas, pelo tempo determinado na Tabela 1.

Posteriormente, para realização da extração enzimática dos colágenos, foi adicionado ácido acético até concentração de 0,5 M e enzima pepsina (Sigma, St. Louis, USA), na proporção 1:2,50 enzima/proteína. As misturas foram agitadas continuamente em Incubadora Shaker (Solab SL-223, Piracicaba, Brasil) a 150 rpm e 4 °C pelo tempo definido na Tabela 1.

Terminada a extração enzimática, foi realizada filtração através de duas camadas de gaze e, posteriormente, os colágenos foram precipitados na presença de 0,05 M de tris (hidroximetil) aminometano, em pH 7,5, através da adição de NaCl até concentração final de 2,6 M. Os colágenos precipitados foram centrifugados a 12000 rpm por 30 minutos, em centrífuga refrigerada (Hitachi, CR22GIII) a 4 °C. Depois de centrifugados os colágenos foram redissolvidos em um pequeno volume de ácido acético 0,5 M, para posterior diálise em membrana de celulose (Typical molecular weight cut-off 14,000 KDa, Sigma, St. Louis, USA), realizada durante dois dias com ácido acético 0,1 M e por dois dias com água destilada, ambos a 4 °C sob agitação e com troca da solução a cada 12 horas. Após a diálise os colágenos foram congelados em freezer (Metalfrio, VF50F) a -22 °C e liofilizados em liofilizador (Terroni, LS 3000, São Carlos, Brasil).

### **2.1.3. Rendimento**

Os rendimentos dos colágenos foram calculados com base no peso úmido e seco do material de partida:

$$\text{Rendimento}(\%) = \frac{\text{peso do colágeno liofilizado (g)}}{\text{peso inicial (úmido ou seco) do resíduo de CMS (g)}} \times 100$$

## **2.2. Caracterização dos colágenos**

### **2.2.1. Determinação do teor de proteínas**

A determinação do teor de proteína dos colágenos seguiu metodologia de Lowry et al. [15], o princípio do método baseia-se na cor azul produzida pelas reações que envolvem a interação de  $\text{Cu}^{+2}$  com os átomos de nitrogênio das ligações peptídicas da proteína e a redução do ácido fosfomolibdato-fosfotungstato por resíduos de tirosina e triptofano de proteínas. A leitura da absorvância foi realizada a 660 nm em espectrofotômetro (Servylab, UV – M51, B, São Leopoldo, RS, Brasil), albumina de soro bovino (Sigma, St. Louis, USA) foi utilizada como padrão.

### **2.2.2. Espectroscopia de Infravermelho Transformada de Fourier (FTIR)**

As características estruturais foram avaliadas através da análise de Espectroscopia de Infravermelho Transformada de Fourier – FTIR em equipamento Shimadzu IR Prestige-21 (Shimadzu Corporation, Japan) utilizando a técnica de reflectância total atenuada (ATR) no intervalo de 400 a 4.000  $\text{cm}^{-1}$ . Foram realizadas 16 varreduras por espectro e 2  $\text{cm}^{-1}$  de resolução.

### **2.2.3. Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC)**

As curvas DSC foram obtidas em um equipamento DSC-Q200 (*TA-Instruments, EUA*), o qual foi previamente calibrado com índio de alto grau de pureza de 99,99%,  $\text{pf} = 156,6 \text{ }^\circ\text{C}$ ,  $\Delta H = 28,56 \text{ J g}^{-1}$ . Para registrar a entalpia e as temperaturas do processo de desnaturação dos colágenos, foram utilizados os seguintes parâmetros: fluxo de ar de 50  $\text{mL min}^{-1}$ , razão de aquecimento de 10  $^\circ\text{C min}^{-1}$  e faixa de aquecimento foi de -20 a 100  $^\circ\text{C}$ . Foram pesados cerca de 3,0 mg de amostra, que foram misturadas com água deionizada em uma proporção de 6:1 (água:colágeno, m/m) e as misturas foram mantidas em repouso durante 120 minutos sob refrigeração (7  $^\circ\text{C}$ ) a fim de equilibrar o teor de umidade e hidratar. As análises foram realizadas em cadinhos de alumínio selados.

### **2.2.4. Análise de Eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE)**

A análise de eletroforese em gel foi baseada no método proposto por Laemmli [16] com modificações. As amostras foram diluídas em água e posteriormente foram adicionados 40  $\mu\text{L}$  de ácido tricloroacético (TCA) 60% e 100  $\mu\text{L}$  de água miliq em 200  $\mu\text{L}$  de amostra em tubos de centrífuga do tipo eppendorfs, esta solução foi armazenada em freezer durante uma noite (12 horas). Posteriormente as amostras foram centrifugadas a 10.000 rpm, 4  $^\circ\text{C}$  por 30 minutos, o sobrenadante foi retirado, tomando cuidado para que o pellet não fosse desfeito.

Foi adicionado 100 µL de solução gelada de acetona 90%, a fim de lavar o pellet sem desfazê-lo, foi feita nova centrifugação por 30 minutos. Novamente o sobrenadante foi removido e adicionado mais 100 µL de acetona 90% gelada e centrifugado nas mesmas condições, removendo novamente o sobrenadante. O precipitado foi ressuspenso com 50 µL do tampão da amostra com 5% de β-mercaptoetanol. Em seguida, as amostras foram desnaturadas em banho-maria a 100 °C por 10 minutos.

Foram utilizados gel de resolução 15% e gel de empilhamento 5%, onde foram adicionados 20 µL das amostras a serem analisadas e 15 µL do padrão de massa molar e submeteu-se a eletroforese a 150 V e 30 mA, num tempo de aproximadamente 2 horas, em cuba de eletroforese vertical. Subsequentemente, o gel foi corado com Coomassie Brilliant Blue R-250 (Bio-Rad Laboratories Inc., Richmond, VA, USA) 0,1% por aproximadamente 12 horas. Posteriormente o gel foi descorado com aquecimento em água destilada em micro-ondas até a perfeita visualização das bandas.

### **2.2.5. Solubilidade**

A solubilidade foi determinada pelo método de Montero et al. [17] com modificações. As amostras foram dissolvidas em ácido acético 0,5 M para se obter uma concentração final de 3 mg/mL e a mistura foi agitada a 4 °C até as amostras serem completamente solubilizadas. As soluções (8 mL) foram transferidas para um tubo de centrifuga de 50 mL e o pH ajustado de 1,0 até 10,0, com NaOH ou HCl. O volume final foi ajustado a 10 mL com água destilada com pH previamente ajustado para o mesmo pH que a solução de colágeno. As soluções foram lentamente agitadas a 4 °C durante 30 min e centrifugadas a 10.000 rpm e 4 °C durante 30 minutos. O teor de proteína no sobrenadante foi determinado pelo método de Lowry et al. [15], utilizando albumina de soro bovino (Sigma, St. Louis, USA) como padrão. A solubilidade relativa dos colágenos foi calculada em comparação com a obtida no pH com maior solubilidade, tornando esta 100%.

### **2.3. Análise Estatística**

Para extração do colágeno foi utilizado um planejamento fatorial 2<sup>2</sup> com ponto central do espaço experimental, que foi realizado em duplicata. Todas as análises foram realizadas em triplicata. Os resultados foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e teste de Tukey, com nível de significância de 5% (p <0,05), utilizando Statistica ®8.0 (StatSoft Inc., Tulsa, OK, EUA). Os cálculos dos efeitos, realizado no rendimento de extração dos colágenos, foram também obtidos pelo programa de computador acima mencionado.

Após a obtenção dos espectros por FTIR, cada espectro foi tratado com a absorvância normalizada entre 0 e 1, suavizada (15 pontos), corrigida na linha de base e removida a zona de CO<sub>2</sub> usando o software Shimadzu IRsolution 1.40. Em seguida, uma tabela com todos os dados foi construída usando o comprimento de onda como coluna e as amostras como linhas, e então testou-se a primeira e segunda derivadas dos espectros utilizando o procedimento EXPAND com o propósito de lineariza-los. Posteriormente, os dados espectrais linearizados (2ª derivada) foram sujeitos a análise de variância multivariada (MANOVA) complementada pela técnica de componentes principais, dos principais picos do espectro FTIR, utilizando os procedimentos GLM, PRINQUAL, PRINCOMP e FACTOR, conforme descrito por Khattree e Naik [18].

Os dados de solubilidade dos diferentes colágenos extraídos de resíduo de CMS de frango em função da variação do pH foram ajustados por função empírica sigmoidal (logística), conforme o modelo estatístico:

$$Y_{ij} = \alpha + \frac{(\beta - \alpha)}{1 + e^{-k(\gamma - \delta)}} + \varepsilon_{ij}$$

em que,  $Y_{ij}$  = solubilidade (%) do  $i$ -ésimo colágeno na  $j$ -ésima repetição sob o pH  $\gamma$ ;  $\alpha$  = solubilidade final (%) na linha de base pós-transição (*post-transition baseline*) ou fase assintótica/estacionária/estado estável (*plateau phase/stationary phase/steady state*), quando  $\gamma \rightarrow \infty$ ;  $\beta$  = solubilidade inicial (%) na linha de base pré-transição (*pre-transition baseline*) ou fase de latência (*lag phase*);  $e$  = exponencial;  $k$  = taxa de alteração na solubilidade;  $\gamma$  = valor de pH (1 a 10);  $\delta$  = ponto no pH em que a solubilidade alcança 50% da amplitude da zona de transição (*transition zone*), ponto médio (*midpoint*) ou ponto de inflexão (*inflection point*);  $\varepsilon_{ij}$  = erro experimental associado a cada observação, pressuposto  $\varepsilon_{ij} \stackrel{iid}{\sim} N(0, \sigma^2)$ . Os parâmetros do modelo foram estimados pelo algoritmo de Gauss-Newton modificado com o procedimento NLIN do SAS<sup>®</sup>.

Com o intuito de verificar a igualdade dos parâmetros e a identidade das equações de regressão não-linear ajustadas para os diferentes colágenos, aplicou-se o teste da razão de verossimilhança com aproximações dadas pelas estatísticas  $\chi^2$  e F [19]. As hipóteses testadas foram:

$H_0^{(1)}$ :  $\beta_1 = \dots = \beta_H$ , isto é, as “H” equações têm  $\beta$  iguais;

$H_0^{(2)}$ :  $\alpha_1 = \dots = \alpha_H$ , isto é, as “H” equações têm  $\alpha$  iguais;

$H_0^{(3)}$ :  $\delta_1 = \dots = \delta_H$ , isto é, as “H” equações têm  $\delta$  comum;

$H_0^{(4)}$ :  $k_1 = \dots = k_H$ , isto é, as “H” equações têm  $k$  comum;

$H_0^{(5)}$ :  $\beta_1 = \dots = \beta_H$ ,  $\alpha_1 = \dots = \alpha_H$ , isto é, as “H” equações têm  $\beta$  e  $\alpha$  iguais;

$H_0^{(6)}$ :  $\beta_1 = \dots = \beta_H$ ,  $\delta_1 = \dots = \delta_H$ , isto é, as “H” equações têm  $\beta$  e  $\delta$  iguais;

$H_0^{(7)}$ :  $\beta_1 = \dots = \beta_H$ ,  $k_1 = \dots = k_H$ , isto é, as “H” equações têm  $\beta$  e  $k$  iguais;

$H_0^{(8)}$ :  $\alpha_1 = \dots = \alpha_H$ ,  $\delta_1 = \dots = \delta_H$ , isto é, as “H” equações têm  $\alpha$  e  $\delta$  iguais;

$H_0^{(9)}$ :  $\alpha_1 = \dots = \alpha_H$ ,  $k_1 = \dots = k_H$ , isto é, as “H” equações têm  $\alpha$  e  $k$  iguais;

$H_0^{(10)}$ :  $\delta_1 = \dots = \delta_H$ ,  $k_1 = \dots = k_H$ , isto é, as “H” equações têm  $\delta$  e  $k$  iguais;

$H_0^{(11)}$ :  $\beta_1 = \dots = \beta_H$ ,  $\alpha_1 = \dots = \alpha_H$ ,  $\delta_1 = \dots = \delta_H$ , ou seja,  $\beta$ ,  $\alpha$  e  $\delta$  iguais;

$H_0^{(12)}$ :  $\beta_1 = \dots = \beta_H$ ,  $\delta_1 = \dots = \delta_H$ ,  $k_1 = \dots = k_H$ , ou seja,  $\beta$ ,  $\delta$  e  $k$  iguais;

$H_0^{(13)}$ :  $\alpha_1 = \dots = \alpha_H$ ,  $\delta_1 = \dots = \delta_H$ ,  $k_1 = \dots = k_H$ , ou seja,  $\alpha$ ,  $\delta$  e  $k$  iguais;

$H_0^{(14)}$ :  $\beta_1 = \dots = \beta_H$ ,  $\alpha_1 = \dots = \alpha_H$ ,  $k_1 = \dots = k_H$ , ou seja,  $\beta$ ,  $\alpha$  e  $k$  iguais;

$H_0^{(15)}$ :  $\tilde{\theta}_1 = \dots = \tilde{\theta}_H$ , isto é, as “H” equações são idênticas, em que  $\tilde{\theta}_h = \begin{bmatrix} \beta_h \\ \alpha_h \\ \delta_h \\ k_h \end{bmatrix}$ .

A estatística do teste da razão de verossimilhança com aproximação pela distribuição  $\chi^2$  é dada por:

$$\chi_{calc}^2(H_0) = -N \ln \left( \frac{\hat{\sigma}_\Omega^2}{\hat{\sigma}_\omega^2} \right) = -N \ln \left( \frac{SQRR_\Omega}{SQRR_\omega} \right) \underset{\sim H_0}{\text{sob}} \chi_{tab}^2(\alpha; \nu)$$

em que,  $\chi_{calc}^2 = \chi^2$  calculado;  $N$  = número total de observações;  $\ln$  = logaritmo natural;  $\hat{\sigma}_\Omega^2$  = estimativa de máxima verossimilhança de  $\sigma^2$  sob nenhuma restrição no espaço paramétrico  $\Omega$  (modelo completo);  $\hat{\sigma}_\omega^2$  = estimativa de máxima verossimilhança de  $\sigma^2$  sob as restrições lineares definidas em  $H_0$  (modelo reduzido);  $SQRR_\Omega$  = soma de quadrados do resíduo da regressão no modelo completo;  $SQRR_\omega$  = soma de quadrados do resíduo da regressão no modelo reduzido;  $\chi_{tab}^2 = \chi^2$  tabelado;  $\alpha$  = nível de significância;  $\nu$  = número de graus de liberdade, sendo  $\nu = p_\Omega - p_\omega$ , ou seja, o número de parâmetros estimados nos modelos completo e reduzido, respectivamente.

A estatística do teste da razão de verossimilhança com aproximação pela distribuição  $F$  é dada por:

$$F_{calc}(H_0) = \frac{(S_p - S_f)/v_e}{S_f/v_f} \underset{\sim H_0}{\text{sob}} F_{tab}(\alpha; v_e; v_f)$$

em que,  $F_{calc} = F$  calculado;  $S_p$  = soma de quadrados residuais do modelo reduzido (sob restrição);  $S_f$  = soma de quadrados residuais do modelo completo;  $v_f$  = número de



graus de liberdade do resíduo do modelo completo;  $\nu_e$  = número de graus de liberdade do resíduo do modelo reduzido menos o número de graus de liberdade do resíduo do modelo completo;  $F_{tab} = F$  tabelado;  $\alpha$  = como definido anteriormente.

O coeficiente de determinação ( $r^2$ ) dos modelos de regressão foi expresso em relação à fonte tratamentos (regressão + falta de ajuste).

As análises estatísticas foram realizadas no aplicativo SAS<sup>®</sup> *System for Windows*<sup>™</sup> versão 9.4 (SAS Institute Inc., Cary - NC, USA), ao nível de 5% de significância.

### **3. Resultados e discussão**

#### **3.1. Rendimento**

Foram testados os efeitos do pré-tratamento com sonda de ultrassom e do tempo de extração enzimática com pepsina na extração do colágeno de resíduo de CMS de frango, o rendimento dos colágenos (Tabela 1) variou de 3,916 a 6,739% em base úmida e de 8,779 a 15,110% em base seca. O tratamento T2 (30 min de pré-tratamento com ultrassom e 48 h de extração enzimática) apresentou o maior rendimento e T4 (24 h de extração enzimática) o menor, os tratamentos T1, T3 e PC não diferiram entre si. Comparando T2 e T3, ambos com 48 horas de extração enzimática, observou-se um aumento de rendimento em torno de 40% na aplicação do pré-tratamento com sonda de ultrassom. Os tratamentos não apresentaram diferença significativa no teor de proteínas (Tabela 1), o que indica que o aumento obtido no rendimento é devido a maior extração de proteínas.

Em estudo de Li et al. [9] o uso concomitante de ultrassom (40 KHz, 120 W) e pepsina na extração de colágeno de tendão bovino apresentou aumento considerável no rendimento em comparação com a extração utilizando apenas pepsina, o rendimento foi de 55,4 para 80,6% em 24 horas e de 71,4 para 88,0% em 48 horas. Segundo os autores, isso se deve ao aumento da atividade enzimática e dissolução do substrato, pois o ultrassom permite uma maior dispersão da pepsina e abertura das fibrilas de colágeno facilitando a ação da enzima.

**Tabela 1** – Tratamentos testados com base no planejamento fatorial completo 2<sup>2</sup> com ponto central e rendimentos e teor de proteína obtidos para os diferentes tratamentos de extração de colágeno de resíduo de CMS de frango.

<b>Trat</b>	<b>Tempo de Ultrassom (min)</b>	<b>Tempo de extração enzimática (h)</b>	<b>Rendimento em Base Úmida (%)</b>	<b>Rendimento em Base Seca (%)</b>	<b>Teor de proteína (%)</b>
<b>T1</b>	30	24	5,101 <sup>b</sup> ± 0,266	11,438 <sup>b</sup> ± 0,596	88,62 <sup>a</sup> ± 1,58
<b>T2</b>	30	48	6,739 <sup>a</sup> ± 0,277	15,110 <sup>a</sup> ± 0,620	88,53 <sup>a</sup> ± 2,91
<b>T3</b>	0	48	4,816 <sup>b</sup> ± 0,227	10,799 <sup>b</sup> ± 0,509	87,05 <sup>a</sup> ± 2,21
<b>T4</b>	0	24	3,916 <sup>c</sup> ± 0,208	8,779 <sup>c</sup> ± 0,467	88,34 <sup>a</sup> ± 2,49
<b>PC</b>	15	36	5,366 <sup>b</sup> ± 0,260	12,032 <sup>b</sup> ± 0,583	86,32 <sup>a</sup> ± 1,51

<sup>a</sup>Médias com letras iguais sobrescritas não diferem significativamente entre si pelo teste de Tukey (p > 0,05).

Valores expressos em média ± desvio padrão.

T1: 30 min de pré-tratamento com ultrassom e 24 h de extração enzimática; T2: 30 min de pré-tratamento com ultrassom e 48 h de extração enzimática; T3: 48 h de extração enzimática; T4: 24 h de extração enzimática; PC: 15 min de pré-tratamento com ultrassom e 36 h de extração enzimática.

Kim et al. [10] avaliaram a amplitude e o tempo do tratamento ultrassônico no rendimento de colágeno de pele de sea bass (*Lateolabrax japonicus*) solúvel em ácido acético. O tratamento ultrassônico aumentou o rendimento, apresentando elevada taxa de extração em amplitudes maiores, rendimentos de 45, 70, 85 e 93% foram obtidos após 24 h de extração com ultrassom em amplitudes de 20, 40, 60 e 80%, respectivamente, o controle (sem ultrassom) apresentou 20% de rendimento em 24h.

Os efeitos das variáveis estudadas (pré-tratamento com sonda de ultrassom e extração enzimática com pepsina) e suas interações sobre o rendimento de colágeno de resíduo de CMS de frango estão apresentados na Tabela 2. Pode ser observado efeito significativo (p < 0,05) de primeira ordem para as duas variáveis testadas, sendo que ambas mostraram influencia positiva no rendimento do colágeno. O efeito da interação entre as duas variáveis também aumentou significativamente o rendimento. Desta forma, maiores tempos de pré-tratamento com ultrassom e de extração enzimática foram mais efetivos na extração do colágeno, dentro das condições testadas.

Wang et al. [20] também obtiveram uma correlação positiva entre o tempo de extração com pepsina e o rendimento de colágeno de pele de carpa capim (*Ctenopharyngodon idella*),

o tempo de extração variou de 12 a 36 horas, sendo o tempo ótimo encontrado para obtenção do maior rendimento o de 35,2 horas.

**Tabela 2** – Valores dos efeitos das variáveis estudadas no rendimento em base seca obtido na extração de colágeno de resíduo de CMS de frango.

	<b>Efeito Estimado</b>	<b>Desvio Padrão</b>	<b>P</b>
<b>Média/Interação</b>	11,632	0,116	<0,0001*
<b>(1) Tempo de Ultrassom</b>	3,485	0,259	<0,0001*
<b>(2) Tempo de extração enzimática</b>	2,846	0,259	<0,0001*
<b>1x2</b>	0,826	0,259	0,024*

\* Significância de 95%.

Wang et al. [21] relataram que a transferência de massa do colágeno da matriz é o papel chave na determinação da eficiência do processo de extração, sendo a taxa de transferência de massa controlada pelo processo de difusão que está associado ao tempo.

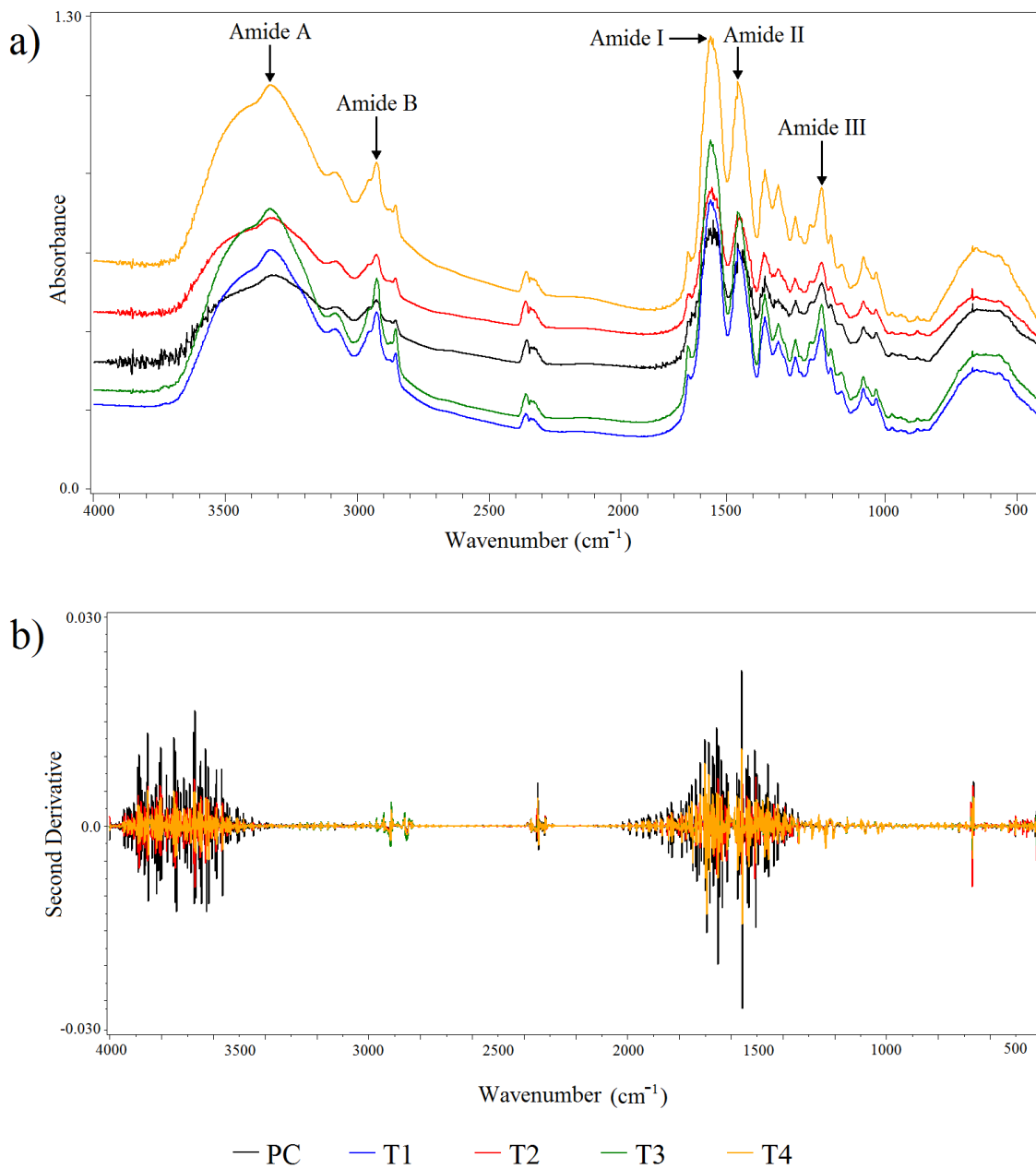
Efeito positivo do ultrassom sobre o rendimento também foi encontrado em estudo de Ran & Wang [8] na extração do colágeno de tendão bovino. O maior rendimento foi obtido com 24 horas de tratamento com ultrassom e 24 horas com pepsina, 6,2% em base seca, o controle, 48 horas de tratamento com pepsina apresentou 2,4% de rendimento. De acordo com Li et al. [9], o ultrassom permite uma melhor dissolução do substrato, pois abre as fibras de colágeno facilitando a extração.

## 3.2. Caracterização dos colágenos

### 3.2.1. Espectroscopia de Infravermelho Transformada de Fourier (FTIR)

Os principais picos dos espectros de infravermelho dos diferentes colágenos de resíduo de CMS de frango estão apresentados na Figura 1a. Os espectros de FTIR encontrados neste estudo se assemelham aos encontrados para colágenos de outras fontes, como, colágeno de pele de pés de frango [22], colágeno de pele de Ema (*Dromaius novaehollandiae*) [7] e pele de lula (*Doryteuthis singhalensis*) [23], com picos de absorção característicos, situados nas regiões das bandas das amidas A e B e I, II e III, para todos os colágenos, o que indica que o uso do ultrassom e da pepsina não afetaram negativamente a integridade dos colágenos.

**Figura 1 – a)** Espectros de FTIR e **b)** segunda derivada dos espectros dos colágenos de resíduo de CMS de frango extraídos utilizando planejamento fatorial em  $2^2$  com ponto central.



T1: 30 min de pré-tratamento com ultrassom e 24 h de extração enzimática; T2: 30 min de pré-tratamento com ultrassom e 48 h de extração enzimática; T3: 48 h de extração enzimática; T4: 24 h de extração enzimática; PC: 15 min de pré-tratamento com ultrassom e 36 h de extração enzimática.

As bandas da amida A foram encontradas entre 3323,35 (PC) e 3329,14 (T2)  $\text{cm}^{-1}$ , sendo associadas a vibrações de estiramento N-H quando o grupo NH do peptídeo está envolvido numa ligações de hidrogênio, pois a posição é deslocada para frequências mais baixas, em torno de 3300  $\text{cm}^{-1}$ , do que uma vibração de estiramento livre de N-H (3400-3440

cm<sup>-1</sup>) [24], indicando que alguns grupos NH do colágeno estão envolvidos em ligações de hidrogênio.

As bandas de amida B dos colágenos foram encontradas em 2926 cm<sup>-1</sup>, e está relacionada com o alongamento assimétrico da vibração de estiramento de CH<sub>2</sub> e a absorção devido a cadeia alquila CH<sub>2</sub> [25].

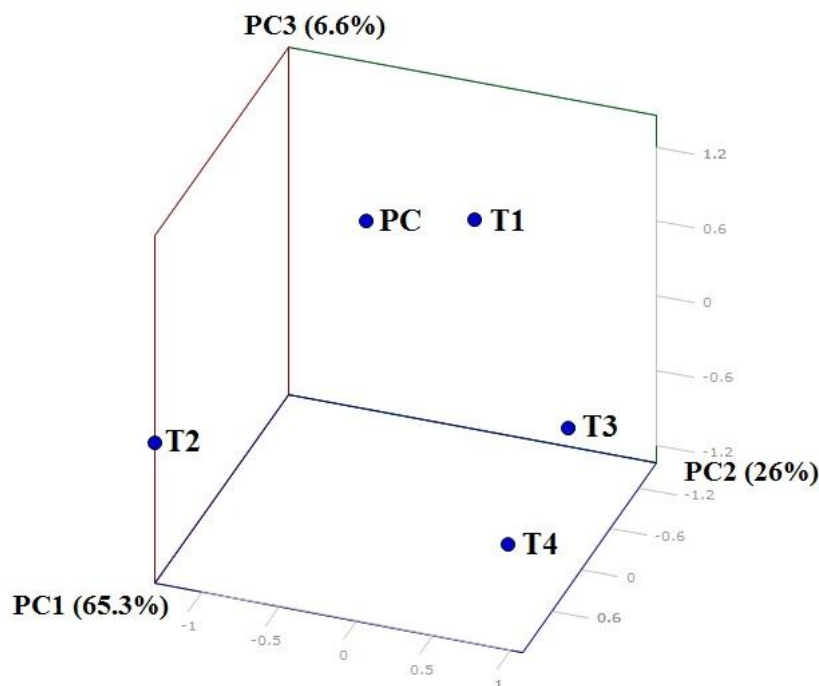
As bandas de amida I, II e III dos diferentes colágenos foram encontradas na região de 1660, 1556 e 1240 cm<sup>-1</sup> respectivamente, estas bandas estão relacionadas a estrutura do colágeno [26]. A banda de amida I, com número de onda característico na faixa de 1600 a 1700 cm<sup>-1</sup>, é associada principalmente às vibrações de estiramento dos grupos carbonila ao longo do esqueleto polipeptídico. As bandas amida II e III representam vibrações de flexão N-H acopladas com vibração de estiramento C-N [27, 28].

A razão entre a área do pico da amida III e o pico em 1454 cm<sup>-1</sup> ficou próxima a 1,0 para todos os colágenos, geralmente esta razão indica a estrutura tripla helicoidal de colágenos. De acordo com este resultado o uso do ultrassom e da pepsina não afetaram negativamente as estruturas de tripla hélice dos colágenos [6].

Nos espectros de FTIR dos colágenos de resíduo de CMS de frango foi aplicado método matemático para o aumento de resolução, através do uso da derivação, a Figura 1b apresenta a segunda derivada dos espectros dos colágenos. Esse método de aumento de resolução se baseia na separação dos picos que compõem as bandas e na correlação de suas áreas ou intensidades com as estruturas [29]. Observou-se que os diferentes colágenos apresentaram os mesmos picos, que são característicos do colágeno, porém com intensidades diferentes.

A análise de componentes principais (PCA) (Figura 2) foi utilizada para verificar semelhanças e diferenças estruturais dos colágenos de acordo com os espectros FTIR, as amostras foram agrupadas de acordo com a similaridade das bandas dos principais picos do espectro, esta análise explicou 97,9% da variância dos dados. Observou-se que os colágenos T3 e T4, aos quais não foi aplicado o pré-tratamento com ultrassom, agruparam-se na parte inferior direita do gráfico, enquanto os colágenos PC e T1 se agruparam na parte superior, mostrando que estes colágenos apresentaram bandas em número de onda (cm<sup>-1</sup>) e intensidade semelhantes entre si. O colágeno T2 distanciou-se dos demais, ficando a esquerda e no centro do gráfico.

**Figura 2** - Gráfico de dispersão 3D obtido pela PCA com base nos principais picos do espectro FTIR dos colágenos de resíduo de CMS de frango.



T1: 30 min de pré-tratamento com ultrassom e 24 h de extração enzimática; T2: 30 min de pré-tratamento com ultrassom e 48 h de extração enzimática; T3: 48 h de extração enzimática; T4: 24 h de extração enzimática; PC: 15 min de pré-tratamento com ultrassom e 36 h de extração enzimática.

### 3.2.2. Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC)

O aquecimento do colágeno acarreta na quebra de ligações de hidrogênio entre as cadeias polipeptídicas, transformando a estrutura de tripla hélice de colágeno em uma estrutura aleatória enrolada. Os resultados da DSC de desnaturação para os tratamentos de colágeno de resíduo de CMS de frango estão apresentados na Tabela 3, e a Figura 3 mostra os termogramas por DSC para os diferentes colágenos.

Os colágenos apresentaram transições endotérmicas correspondentes à desnaturação do colágeno, cuja temperatura inicial variou entre 42,91 e 46,94 °C, com entalpias entre 15,19 e 21,12 J/g. O tratamento T4, extraído com pepsina por 24 h, foi o que obteve maior temperatura e entalpia de desnaturação, ou seja, apresentou maior estabilidade térmica frente aos demais, o que se deve, provavelmente, a este colágeno possuir uma estrutura helicoidal mais íntegra. A menor temperatura inicial de desnaturação ( $T_0$ ) foi apresentada pelo PC (15 min de pré-tratamento com ultrassom e 36 h de extração enzimática), porém não diferiu de T1.

**Tabela 3** – Resultados da DSC de desnaturação dos colágenos de resíduo de CMS de frango extraídos utilizando planejamento fatorial em 2<sup>2</sup> com ponto central.

Tratamento	To (°C)	Tp (°C)	Tc (°C)	ΔH (J/g)
<b>T1</b>	43,14 <sup>cd</sup> ± 0,6	46,31 <sup>c</sup> ± 0,17	54,97 <sup>a</sup> ± 0,55	15,19 <sup>e</sup> ± 0,14
<b>T2</b>	43,89 <sup>c</sup> ± 0,34	47,62 <sup>b</sup> ± 0,07	54,66 <sup>ab</sup> ± 0,11	19,51 <sup>b</sup> ± 0,33
<b>T3</b>	44,67 <sup>b</sup> ± 0,05	47,67 <sup>b</sup> ± 0,04	50,27 <sup>c</sup> ± 0,84	17,32 <sup>d</sup> ± 0,33
<b>T4</b>	46,94 <sup>a</sup> ± 0,07	49,91 <sup>a</sup> ± 0,04	55,36 <sup>a</sup> ± 0,39	21,12 <sup>a</sup> ± 0,20
<b>PC</b>	42,91 <sup>d</sup> ± 0,07	46,43 <sup>c</sup> ± 0,32	53,55 <sup>b</sup> ± 0,42	18,41 <sup>c</sup> ± 0,24

<sup>a</sup>Médias com letras iguais sobrescritas não diferem significativamente entre si pelo teste de Tukey (p> 0,05). Valores expressos em média ± desvio padrão.

To “onset” temperatura inicial, Tp temperatura de pico, Tc “endset” temperatura de conclusão, ΔH entalpia de desnaturação.

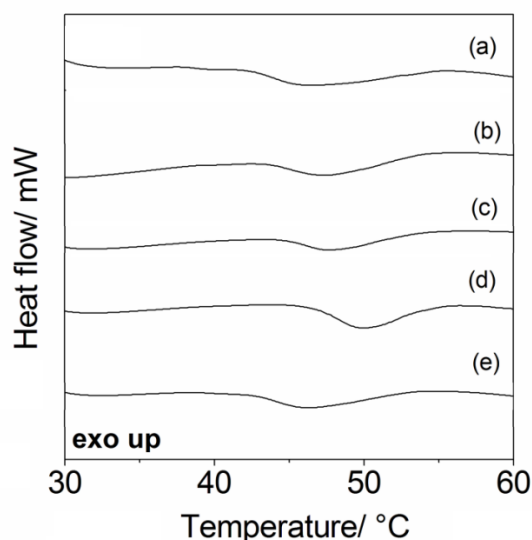
T1: 30 min de pré-tratamento com ultrassom e 24 h de extração enzimática; T2: 30 min de pré-tratamento com ultrassom e 48 h de extração enzimática; T3: 48 h de extração enzimática; T4: 24 h de extração enzimática; PC: 15 min de pré-tratamento com ultrassom e 36 h de extração enzimática.

Resultado distinto foi obtido por Zou et al. [30] na extração de colágeno de tartaruga, onde o uso do ultrassom acarretou em aumento da temperatura de desnaturação do colágeno em comparação com o método convencional.

Zeng et al. [31] mencionaram temperaturas de desnaturação de colágeno de pele de cobia (*Rachycentron canadum*) entre 33,97 e 34,62 °C e entalpia de 41,23 a 51,36 J/g. Outros estudos mencionaram temperaturas de desnaturação do colágeno entre 30 e 60 °C, dependendo da origem e tipo de colágeno, sendo a temperatura de desnaturação térmica correlacionada com o seu conteúdo dos aminoácidos prolina e hidroxiprolina, quanto maior o teor destes aminoácidos mais estável é a estrutura helicoidal da molécula [8, 32, 33].

De maneira geral, todos os diferentes tratamentos de colágeno apresentaram boa estabilidade térmica, indicando que o uso do ultrassom e da pepsina na extração não foi prejudicial á estabilidade dos colágenos dentro das condições testadas.

**Figura 3** - Termograma por DSC para os colágenos de resíduo de CMS de frango extraídos utilizando planejamento fatorial em  $2^2$  com ponto central.



(a) T1: 30 min de pré-tratamento com ultrassom e 24 h de extração enzimática; (b) T2: 30 min de pré-tratamento com ultrassom e 48 h de extração enzimática; (c) T3: 48 h de extração enzimática; (d) T4: 24 h de extração enzimática; (e) PC: 15 min de pré-tratamento com ultrassom e 36 h de extração enzimática.

### 3.2.3. Análise de Eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE)

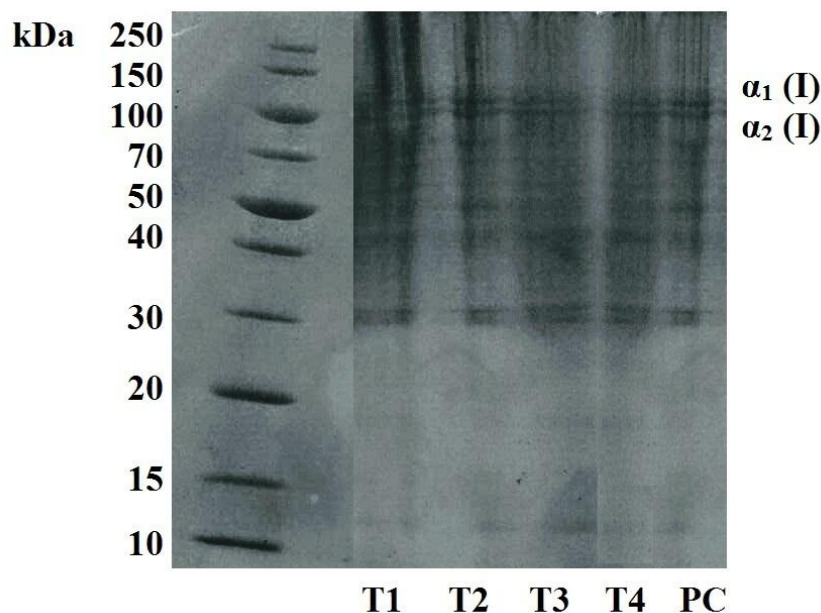
A Figura 4 apresenta o SDS-PAGE dos diferentes tratamentos dos colágenos de resíduo de CMS de frango utilizando gel a 15%. São identificadas duas bandas distintas, próximo a 125 kDa, correspondentes as cadeias  $\alpha_1$  e  $\alpha_2$ , indicando que os colágenos são constituídos principalmente por colágeno do tipo I, que consiste geralmente de duas cadeia  $\alpha_1$  e uma cadeia  $\alpha_2$ . As bandas da cadeia  $\beta$  não foram identificadas, e foi possível verificar algumas proteínas de menor peso molecular, entre 100 e 30 kDa, para todos os tratamentos.

Constatou-se que o pré-tratamento com sonda ultrassônica em T1, T2 e PC não levou ao aparecimento de peptídeos de baixo peso molecular, comprovando que o uso do ultrassom não afetou negativamente a integridade dos colágenos, que mantiveram a estrutura de tripla hélice intacta, resultado também confirmado pelos espectros de FTIR (Figura 1).

A estrutura preservada se deve, provavelmente, ao ultrassom ter sido empregado em temperatura controlada (4 °C) e por um curto período de tempo, 15 ou 30 minutos, pois em estudo de Kim et al. [10], com colágeno de pele de peixe, certas substâncias desconhecidas, consideradas produtos da degradação do colágeno, induzidas pelo tratamento ultrassônico, foram observadas com tempos de tratamento mais longos.



**Figura 4** - Eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) dos colágenos de resíduo de CMS de frango extraídos utilizando planejamento fatorial em  $2^2$  com ponto central.



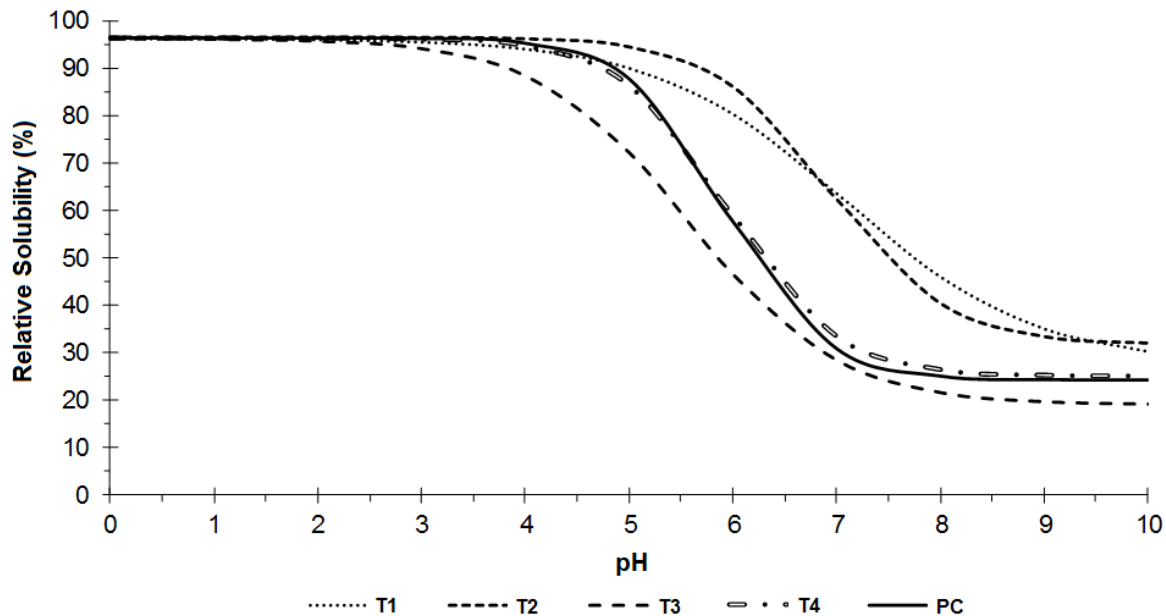
T1: 30 min de pré-tratamento com ultrassom e 24 h de extração enzimática; T2: 30 min de pré-tratamento com ultrassom e 48 h de extração enzimática; T3: 48 h de extração enzimática; T4: 24 h de extração enzimática; PC: 15 min de pré-tratamento com ultrassom e 36 h de extração enzimática.

### 3.2.4. Solubilidade

Os dados de solubilidade para os diferentes tratamentos de colágeno de resíduo de CMS de frango foram ajustados por função empírica sigmoideal, e as curvas de solubilidade relativa em função do pH obtidas estão apresentadas na Figura 5. A solubilidade inicial ( $\beta$ ) não diferiu ( $p > 0,05$ ) entre os tratamentos, a média obtida foi de 96,5%, e se manteve constante até próximo do pH 3,0, indicando que todos os colágenos apresentaram boa solubilidade em pH ácido. Os tratamentos apresentaram diferenças significativas nos valores de solubilidade final ( $\alpha$ ), pH no ponto de inflexão ( $\delta$ ) e taxa de decréscimo na solubilidade ( $\kappa$ ).

Todos os colágenos apresentaram queda acentuada na solubilidade com o aumento do pH, entre 5 e 8, porém a taxa de alteração na solubilidade ( $\kappa$ ) foi superior nos tratamentos T2, T4 e PC. Os tratamentos T1 e T2 (ambos com 30 minutos de pré-tratamento ultrassônico) apresentaram maior pH no ponto de inflexão, próximo a 7,0, indicando maior solubilidade destes colágenos, uma vez que este ponto indica o pH em que a solubilidade alcança 50%. Estes mesmos colágenos também apresentaram solubilidade final ( $\alpha$ ) superior aos demais tratamentos.

**Figura 5** – Curvas de solubilidade relativa em função do pH (0 a 10) dos colágenos de resíduo de CMS de frango extraído conforme planejamento fatorial  $2^2$



T1: 30 min de pré-tratamento com ultrassom e 24 h de extração enzimática; T2: 30 min de pré-tratamento com ultrassom e 48 h de extração enzimática; T3: 48 h de extração enzimática; T4: 24 h de extração enzimática; PC: 15 min de pré-tratamento com ultrassom e 36 h de extração enzimática.

A solubilidade mínima das proteínas ocorre no ponto isoeletrico (pI). Nesse estado, a carga líquida da superfície da proteína é zero e predominam as interações hidrofóbicas, devido à falta de repulsões eletrostáticas. Desta forma, as proteínas tendem à agregação e à precipitação [34].

Chi et al. [35] também observaram solubilidade máxima em pH de 1 a 4 e queda intensa em pH de 5 a 7 para colágeno solúvel em ácido da pele de tubarão-martelo (*Sphyrna lewini*).

Em estudo de Ran & Wang [8] o colágeno de tendão bovino extraído com pepsina após tratamento ultrassônico em solução de ácido acético apresentou elevada solubilidade em pH de 2 a 4, superior a 92%, e acentuada diminuição próximo a neutralidade, 21% em pH 6, se mantendo baixa mas relativamente estável até pH 9.

#### 4. Conclusão

Tanto o pré-tratamento com ultrassom quanto o tempo de extração enzimática com pepsina apresentaram efeito positivo sobre o rendimento de extração do colágeno de resíduo

de CMS de frango sem afetar a integridade dos colágenos, o que foi comprovado pelos espectros FTIR, que apresentaram picos de absorção característicos, situados nas regiões das bandas das amidas A e B e I, II e III, e pela análise de eletroforese. A aplicação do ultrassom acarretou em um aumento de rendimento em torno de 40% no tratamento T2 (pré-tratado por 30 minutos com ultrassom e extraído com pepsina por 48 horas) em comparação com T3 (extraído com pepsina por 48 horas).

Todos os tratamentos exibiram elevada estabilidade térmica. O tratamento extraído com pepsina por 24 h (T4), foi o que obteve maior temperatura de desnaturação, 46,96 °C. A SDS-PAGE mostrou que todos os colágenos são constituídos, principalmente, por colágeno do tipo I, e o uso do ultrassom não acarretou no aparecimento de peptídeos de baixo peso molecular.

Diante do exposto pode-se concluir que o uso do ultrassom como pré-tratamento e a extração enzimática com pepsina são eficazes em aumentar o rendimento de extração do colágeno de resíduo de CMS de frango, preservando a estrutura helicoidal tripla do colágeno nativo.

### **Referencias Bibliográficas**

- [1] S. Damodaran, K. Parkin, O. R. Fennema, Química de alimentos de fennema. 4<sup>a</sup> ed. São Paulo: Artmed, 2010.
  
- [2] S. E. Kim, E. Mendis, Bioactive compounds from marine processing byproducts – a review. Food Res. Int. 39 (2006) 383-393.
  
- [3] M. C. Gómez-Guillén, B. Giménez, M. E. López-Caballero, M. P. Montero, Functional and bioactive properties of collagen and gelatin from alternative sources: A review. Food Hydrocoll. 25 (2011) 1813-1827.
  
- [4] E. Jeevithan, W. Wu, W. Nanping, H. Lan, B. Bao, Isolation, purification and characterization of pepsin soluble collagen isolated from silvertip shark (*Carcharhinus albimarginatus*) skeletal and head bone. Process Biochem. 49 (2014) 1767-1777.
  
- [5] Z. R. Li, B. Wang, B.; C. F. Chi, Q. H. Zhang, Y. D. Gong, J. J. Tang, H. Y. Luo, G. F. Ding, Isolation and characterization of acid soluble collagens and pepsin soluble collagens

from the skin and bone of Spanish mackerel (*Scomberomorous niphonius*). Food Hydrocoll. 31 (2013) 103-113.

[6] L. Wang, Q. Liang, Z. Wang, J. Xu, Y. Liu, H. Ma, Preparation and characterization of type I collagens from skin of Amur sturgeon (*Acipenser schrenckii*). Food Chem. 148 (2014) 410-414.

[7] T. Nagai, Y. Tanoue, N. Kai, N. Suzuki, Characterization of collagen from emu (*Dromaius novaehollandiae*) skins. J. Food Sci. Technol. 52 (2015) 2344-2351

[8] X. G. Ran, L. Y. Wang, Use of ultrasonic and pepsin treatment in tandem for collagen extraction from meat industry by-products. J. Sci. Food Agric. 94 (2014) 585-590.

[9] D. Li, C. Mu, S. Cai, W. Lin, Ultrasonic irradiation in the enzymatic extraction of collagen. Ultrason. Sonochem. 16 (2009) 605-609.

[10] H. K. Kim, Y. H. Kim, Y. J. Kim, H. J. Park, N. H. Lee, Effects of ultrasonic treatment on collagen extraction from skins of the sea bass *Lateolabrax japonicus*. Fisheries Sci. 78 (2012) 485-490.

[11] H. Hu, X. Fan, Z. Zhou, X. Xu, G. Dan, L. Wang, X. Huang, S. Pan, L. Zhu, Acid-induced gelation behavior of soybean protein isolate with high intensity ultrasonic pre-treatments. Ultrason. Sonochem. 20 (2013) 187-195.

[12] F. Chemat, M. K. Khan, Applications of ultrasound in food technology: processing, preservation and extraction. Ultrason. Sonochem. 18 (2011) 813-835.

[13] Instituto Adolfo Lutz. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Métodos Físico-Químicos para Análises de Alimentos, Ministério da Saúde, Agência Nacional de Vigilância Sanitária, Brasília, Ministério da Saúde, 2008.

[14] R. Duan, J. J. Zhang, X. Q. Du, X. C. Yao, K. Konno, Properties of collagen from skin, scale and bone of carp (*Cyprinus carpio*). Food Chem. 112 (2009) 702-706.

- [15] O. H. Lowry, N. J. Rosebrough, A. L. Farr, R. J. Randall, Protein measurement with Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193 (1951) 256–275.
- [16] U. K. Laemmli, Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nat.* 22 (1970) 680-685.
- [17] P. Montero, F. Jimenez-Colmenero, J. Borderias, Effect of pH and the presence of NaCl on some hydration properties of collagenous material from trout (*Salmoirideus Gibb*) muscle and skin. *J. Sci Food Agric.* 54 (1991) 137–146.
- [18] R. Khattree, D. N. Naik, Multivariate data reduction and discrimination with SAS Software. North Carolina: SAS Institute, 2000.
- [19] A. J. Regazzi, C. H. O. Silva, Teste para verificar a igualdade de parâmetros e a identidade de modelos de regressão não-linear. I. dados no delineamento inteiramente casualizado. *Revista de Matemática e Estatística* 22 (2004) 33-45.
- [20] L. Wang, B. Yang, R. Wang, X. Du, Extraction of pepsin-soluble collagen from grass carp (*Ctenopharyngodon idella*) skin using an artificial neural network. *Food Chem.* 111 (2008) 683-686.
- [21] L. Wang, B. Yang, X. Du, Extraction of acid-soluble collagen from grass carp (*Ctenopharyngodon idella*) skin. *J. Food Process Eng.* 32 (2009) 743-751.
- [22] C. Zhou, Y. Li, X. Yu, H. Yang, H. Ma, A. E. A. Yagoub, Y. Cheng, J. Hu, P. N. Y. Otu, Extraction and characterization of chicken feet soluble collagen. *LWT-Food Sci. Technol.* 74 (2016) 145-153.
- [23] A. Veeruraj, M. Arumugam, T. Ajithkumar, T. Balasubramanian, Isolation and characterization of collagen from the outer skin of squid (*Doryteuthis singhalensis*). *Food Hydrocoll.* 43 (2015) 708-716.

- [24] K. P. Sai, M. Babu, Studies on *Rana tigerina* skin collagen. *Comp. Biochem. Physiol. Part B: Biochem. Mol. Biol.* 128 (2001) 81-90.
- [25] B. L. Hsu, Y. M. Weng, Y. H. Liao, W. Chen, Structural investigation of edible zein films/coatings and directly determining their thickness by FT-Raman spectroscopy. *J. Agric Food Chem.* 53 (2005) 5089-5095.
- [26] M. S. Heu, J. H. Lee, H. J. Kim, S. J. Jee, J. S. Lee, Y. J. Jeon, F. Shahidi, J. S. Kim, Characterization of acid-and pepsin-soluble collagens from flatfish skin. *Food Sci Biotechnol.* 19 (2010) 27-33.
- [27] M. Jackson, P. H. Watson, W. C. Halliday, H. H. Mantsch, Beware of connective tissue proteins: assignment and implications of collagen absorptions in infrared spectra of human tissues. *Biochimica et Biophys. Acta* 270 (1995) 1-6.
- [28] A. Barth, C. Zscherp, What vibrations tell about proteins. *Q. Rev. Biophys.* 35 (2002) 369-430.
- [29] L. A. Forato, R. Bernardes Filho, L. A. Colnago, Estudo de métodos de aumento de resolução de espectros de FTIR para análise de estruturas secundárias de proteínas. *Quím. Nova* 21 (1998) 146-150.
- [30] Y. Zou, L. Wang, P. Cai, P. Li, M. Zhang, Z. Sun, C. Sun, W. Xu, D. Wang, Effect of ultrasound assisted extraction on the physicochemical and functional properties of collagen from soft-shelled turtle calipash. *Int. J. Biol. Macromol.* 105 (2017) 1602-1610.
- [31] S. Zeng, J. Yin, S. Yang, C. Zhang, P. Yang, W. Wu, Structure and characteristics of acid and pepsin-solubilized collagens from the skin of cobia (*Rachycentron canadum*). *Food Chem.* 135 (2012) 1975-1984.
- [32] S. Sinthusamran, S. Benjakul, H. Kishimura, Comparative study on molecular characteristics of acid soluble collagens from skin and swim bladder of seabass (*Lates calcarifer*). *Food Chem.* 138 (2013) 2435-2441.

- [33] W. Liu, Z. Tian, C. Li, G. Li, Thermal denaturation of fish collagen in solution: A calorimetric and kinetic analysis. *Thermochimica Acta* 581 (2014) 32-40.
- [34] E. P. Ribeiro, E. A. G. Seravalli, E. A. G. Proteínas. *Química de Alimentos*. 2a ed. São Paulo: Blucher, 2007.
- [35] C. F. Chi, B. Wang, Z. R. Li, H. Y. Luo, G. F. Ding, C. W. Wu, Characterization of Acid-soluble Collagen from the Skin of Hammerhead Shark (*Sphyrna lewini*). *J. Food Biochem.* 38 (2014) 236-247.





### **3.4. Manuscrito 4**

## **CARACTERIZAÇÃO DE HIDROLISADOS DO COLÁGENO DE RESÍDUO DE CMS DE FRANGO**

**Artigo em fase final de revisão para ser submetido à Revista International Food  
Research Journal (IFRJ)**

(Formatado conforme as normas da revista)

## **Caracterização de hidrolisados do colágeno de resíduo de CMS de frango**

Schmidt M. M.<sup>1\*</sup>, Fontoura A. M.<sup>1</sup>, Vidal A. R.<sup>1</sup>, Dornelles R. C. P.<sup>1</sup>, Kubota E. H.<sup>1</sup>, Cansian R. L.<sup>2</sup>, Demiate I. M.<sup>3</sup>, de Oliveira C. S.<sup>3</sup>

<sup>1</sup> Federal University of Santa Maria, Department of Science and Food Technology, Avenida Roraima, 1000, 97105-900, Camobi, Santa Maria RS, Brazil.

<sup>2</sup> Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e das Missões, Departamento de Ciência e Tecnologia de Alimentos, Avenida Sete de Setembro, 1621, 99709-910, Erechim RS, Brasil.

<sup>3</sup> State University of Ponta Grossa, Department of Food Engineering, Avenida General Carlos Cavalcanti, 4748, 84030-000, Ponta Grossa PR, Brazil.

\*Corresponding author: Michele M. Schmidt. Address: Rua Silva Jardim, nº 1892, apto 303, 97010-492, centro, Santa Maria, Rio Grande do Sul, Brazil,

Tel: +55 55 91355181 e +55 55 33175181. E-mail:

[mixi.schmidt@gmail.com](mailto:mixi.schmidt@gmail.com)

## Resumo

O processo de elaboração da carne mecanicamente separada (CMS) de frango gera grande quantidade de resíduo, o qual possui baixo valor comercial, a obtenção de colágeno e hidrolisados a partir desta matéria-prima é uma boa opção para agregar valor a estes resíduos. A hidrólise gera pequenos fragmentos de peptídeos, com uma variedade de aplicações. As enzimas Alcalase<sup>®</sup> e Flavourzyme<sup>®</sup> tem sido amplamente utilizadas na obtenção de hidrolisados proteicos. O objetivo deste estudo foi a obtenção e caracterização das propriedades funcionais, estruturais e estabilidade térmica, de hidrolisados de colágeno a partir do resíduo do processamento de CMS de frango, utilizando para as hidrólises as enzimas Alcalase<sup>®</sup> e Flavourzyme<sup>®</sup>. O maior grau de hidrólise foi obtido com a enzima Alcalase<sup>®</sup>, 36,11%, enquanto a Flavourzyme<sup>®</sup> apresentou 12,02%. A DSC do colágeno de resíduo de CMS indicou temperatura de desnaturação de 46,47 °C. O espectro FTIR do colágeno bruto mostrou picos de absorção característicos das amidas A e B e I, II e III, nos espectros dos colágenos hidrolisados a área das bandas das amidas foram reduzidas e houve o aparecimento de alguns picos entre 800 a 1200 cm<sup>-1</sup> comprovando a hidrólise do colágeno em peptídeos menores. O desaparecimento de bandas de elevado peso molecular no SDS-PAGE também confirmam a hidrólise do colágeno. Após as hidrólises o colágeno apresentou redução na viscosidade, capacidade de formação e estabilidade da espuma. Já o índice de atividade emulsificante foi elevado nos hidrolisados em relação ao colágeno bruto. Deste modo, o uso das

enzimas Alcalase<sup>®</sup> e Flavourzyme<sup>®</sup> para obtenção de hidrolisados a partir de colágeno de resíduo de CMS de frango se mostrou viável e com potencial para aplicação industrial.

**Palavras-chave:** Alcalase<sup>®</sup>, Flavourzyme<sup>®</sup>, Propriedades Funcionais, FTIR, Eletroforese.

## **Introdução**

A produção mundial de carne de frango em 2016 foi de 88,718 milhões de toneladas, sendo o Brasil o segundo maior produtor, com 12,69 milhões de toneladas (ABPA, 2017). Cerca de 20% da produção de frango no Brasil são transformadas em carne mecanicamente separada (CMS) (Negrão et al., 2005) e, o resíduo gerado no processo de extração é da ordem de 15% a 45%. Grande parte do resíduo é destinado à fabricação de ração, onde este material é pouco valorizado e neste sentido a obtenção de colágeno e hidrolisados a partir desta matéria-prima seria uma opção para agregar valor a estes resíduos.

A hidrólise enzimática realizada em condições brandas e controladas garante a manutenção da qualidade nutricional dos hidrolisados e um perfil peptídico definido. A hidrólise é capaz de modificar e até melhorar as características funcionais das proteínas, devido à formação de peptídeos e aminoácidos livres (Bhaskar, et al. 2007; Halim et al., 2016), além disso, já é conhecido que alguns destes peptídeos e aminoácidos possuem capacidade antioxidante, antimicrobiana e anti-

hipertensiva (Farin et al. 2016; Fu et al., 2016; Halim et al., 2016; Cheung e Li-Chan, 2017).

Os pequenos fragmentos de peptídeos gerados na hidrólise tornam os hidrolisados proteicos uma ótima fonte de aminoácidos disponíveis. Com isso, os hidrolisados apresentam uma grande variedade de aplicações, incluindo produtos farmacêuticos, cosméticos e nutrição animal (Wergedahl et al., 2004; Chalamaiah et al., 2012).

As enzimas Alcalase<sup>®</sup> e Flavourzyme<sup>®</sup> têm sido amplamente utilizadas na obtenção de hidrolisados proteicos. A Alcalase<sup>®</sup> é produzida pela fermentação submersa do microrganismo *Bacillus licheniformis*, é utilizada em altas temperaturas e moderada alcalinidade (Jung et al., 2008). A Flavourzyme<sup>®</sup> é uma protease fúngica complexa produzida pela fermentação submersa de uma linhagem selecionada de *Aspergillus oryzae* que não foi geneticamente modificado, é utilizada sob condições neutras ou ligeiramente ácidas (Slizyte et al, 2005).

O objetivo deste estudo foi a obtenção de hidrolisados de colágeno, a partir do resíduo do processamento de carne mecanicamente separada de frango, utilizando as enzimas Alcalase<sup>®</sup> e Flavourzyme<sup>®</sup>, bem como a caracterização das suas propriedades funcionais, estruturais e estabilidade térmica

## **Material e métodos**

A matéria-prima (resíduo do processo de extração de CMS de frango) congelada foi doada pela Cooperativa Central Aurora (Aurora

Alimentos) unidade de Erechim (RS), que utilizada a máquina High Tech modelo HT- 6.0 SS para elaboração do CMS, com capacidade de 6000 kg/h, potência de 50 CV e peso de 1680 kg. O resíduo de CMS foi mantido em freezer (Metalfrío, VF50F) a -22 °C até utilização.

As enzimas Flavourzyme<sup>®</sup> 1000L e Alcalase<sup>®</sup> 2.4L (Novozymes<sup>®</sup>, Araucária PR, Brasil) foram fornecidas pela empresa Tovani Benzaquen Ingredientes (São Paulo, SP, Brasil) e os demais reagentes utilizados foram de grau analítico (PA).

#### *Obtenção do colágeno*

Primeiramente foi realizado um pré-tratamento do resíduo de CMS de frango seguindo metodologia de Li et al. (2013a) e Duan et al. (2009) com adaptações. Inicialmente com solução de hidróxido de sódio (NaOH) 0,1 M por 48 horas, com razão amostra/solução alcalina 1:20 (p/v), e troca da solução a cada 12 horas. Após foi utilizada solução de EDTA-2Na (Ácido Etilenodiaminatetracético Dissódico) 0,5 M (pH 7,5) por cinco dias, com razão amostra/solução 1:10 (p/v). Por fim, foi utilizado álcool butílico 10% por 48 horas, com razão sólido/solvente de 1:10 (p/v), com troca do solvente a cada 12 horas.

Após o pré-tratamento o colágeno foi extraído com pepsina seguindo metodologia proposta por Kittiphattanabawon et al. (2010) com modificações. O resíduo de CMS foi adicionado de ácido acético 0,5 M, contendo a enzima pepsina (extraída da mucosa gástrica porcina, em pó,  $\geq 400$  unidades/mg de proteína, Sigma, St. Louis, USA), na proporção

1:2,50 enzima/proteína, com razão sólido/solvente de 1:15 (p/v), a mistura foi agitada continuamente por três dias, seguido de filtração através de duas camadas de gaze. Todos os procedimentos de pré-tatamento e extração foram realizados sob agitação em Incubadora Shaker (Solab SL-223, Piracicaba, Brasil) a 150 rpm e 4 °C.

Posteriormente, o colágeno foi precipitado na presença de 0,05 M de tris (hidroximetil) aminometano, em pH 7,5, através da adição de NaCl até concentração final de 2,6 M. O colágeno precipitado foi centrifugado a 12000 rpm por 30 minutos, em centrífuga refrigerada (Hitachi, CR22GIII) a 4 °C e, após, foi realizada diálise em membrana de celulose (Typical molecular weight cut-off 14,000 KDa, Sigma, St. Louis, USA), durante dois dias com ácido acético 0,1 M e dois dias com água destilada, ambos a 4 °C sob agitação e com troca da solução a cada 12 horas. Por fim, o colágeno foi congelado em freezer (Metalfrio, VF50F) a -22 °C e liofilizado em liofilizador (Terroni, LS 3000, São Carlos, Brasil).

#### *Obtenção dos hidrolisados de colágeno*

Para realização das hidrólises enzimáticas foi seguida metodologia de Schmidt e Salas-Mellado (2009) com algumas modificações. As hidrólises foram realizadas em frascos de vidro fechados, imersos em banho ultratermostático (Modelo SL152, potência de 2000 W, SOLAB, Piracicaba, SP, Brasil) para controle da temperatura.

Para hidrólise com a enzima Flavourzyme<sup>®</sup> o colágeno foi homogeneizado em uma solução tampão fosfato de pH 7,0 contendo a

enzima e foi colocado no banho com temperatura de 50 °C por 2 horas, a inativação da enzima foi feita por 15 minutos a 75 °C. Na hidrólise com Alcalase<sup>®</sup> foi utilizado tampão fosfato de pH 7,5 e temperatura de 55 °C por 2 horas, a inativação foi feita por 15 minutos a 85 °C. Para ambas as hidrólises a quantidade de colágeno adicionado foi de 4% (m/v) em relação ao volume de tampão e 8% (v/m) de enzima em relação a massa de colágeno.

Ao final da hidrólise os hidrolisados com Alcalase<sup>®</sup> e Flavourzyme<sup>®</sup> foram congeladas em freezer (Metalfrio, VF50F) a -22 °C e liofilizadas em liofilizador (Terroni, LS 3000, São Carlos, Brasil).

#### *Caracterização do colágeno e dos hidrolisados*

##### *Grau de hidrólise*

Para determinação do grau de hidrólise dos hidrolisados obtidos com Alcalase<sup>®</sup> e Flavourzyme<sup>®</sup> foi utilizado o método de Lowry *et al.* (1951). O grau de hidrólise foi calculado com base na quantidade de proteína do colágeno bruto de resíduo de CMS e albumina bovina foi utilizada como padrão (Sigma-Aldrich Brasil Ltda, São Paulo, SP, Brasil), quanto maior o grau de hidrólise maior a porcentagem de ligações peptídicas clivadas em relação ao total de ligações peptídicas.

##### *Espectroscopia de Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR)*



Para avaliação das características estruturais foi realizada análise de Espectroscopia de Infravermelho com Transformada de Fourier – FTIR em equipamento Shimadzu IR Prestige-21 (Shimadzu Corporation, Japan) utilizando a técnica de reflectância total atenuada (ATR) no intervalo de 400 a 4.000  $\text{cm}^{-1}$ . Foram realizadas 16 varreduras por espectro e 2  $\text{cm}^{-1}$  de resolução.

#### *Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC)*

A curva de DSC foi obtida em equipamento DSC-Q200 (TA-Instruments, EUA), que foi previamente calibrado com índio de alto grau de pureza (99,99%,  $\text{pf} = 156,6 \text{ }^\circ\text{C}$ ,  $\Delta H = 28,56 \text{ J g}^{-1}$ ). Os parâmetros utilizados no processo de desnaturação foram: fluxo de ar de 50  $\text{mL min}^{-1}$ , razão de aquecimento de 10  $^\circ\text{C min}^{-1}$  e faixa de aquecimento de -20 a 100  $^\circ\text{C}$ . Para a análise, cerca de 3,0 mg de cada amostra foi misturada com água deionizada em uma proporção de 6:1 (água: amostra, m/m) e a mistura foi mantida em repouso a 7  $^\circ\text{C}$  durante 120 minutos, com objetivo de equilibrar o teor de umidade e hidratar a amostra. A análise foi realizada em cadinhos de alumínio selados.

#### *Análise de eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE)*

A análise de eletroforese em gel foi baseada no método proposto por Laemmli (1970) com modificações. As amostras foram diluídas em água e posteriormente foram adicionados 40  $\mu\text{L}$  de ácido tricloroacético (TCA) 60% e 100  $\mu\text{L}$  de água milliq em 200  $\mu\text{L}$  de amostra em tubos de

centrífuga do tipo eppendorfs, esta solução foi armazenada em freezer por cerca de 12 horas. Posteriormente as amostras foram centrifugadas a 10.000 rpm, 4 °C por 30 minutos, o sobrenadante foi retirado, tomando cuidado para que o pellet não fosse desfeito. Foi adicionado 100 µL de solução gelada de acetona 90%, a fim de lavar o pellet sem desfazê-lo, foi feita nova centrifugação por 30 minutos. Novamente o sobrenadante foi removido e adicionado mais 100 µL de acetona 90% gelada e centrifugado nas mesmas condições, removendo novamente o sobrenadante. O precipitado foi ressuspenso com 50 µL do tampão da amostra com 5% de β-mercaptoetanol. Em seguida, as amostras foram desnaturadas em banho-maria a 100 °C por 10 minutos.

Foram utilizados gel de resolução 15% e gel de empilhamento 5%, onde foram adicionados 20 µL das amostras a serem analisadas e 15 µL do padrão de massa molar e submeteu-se a eletroforese a 150 V e 30 mA, num tempo de aproximadamente 2 horas, em cuba de eletroforese vertical. Subsequentemente, o gel foi corado com Coomassie Brilliant Blue R-250 (Bio-Rad Laboratories Inc., Richmond, VA, USA) 0,1% por aproximadamente 12 horas. Posteriormente o gel foi descorado com aquecimento em água destilada em micro-ondas até a perfeita visualização das bandas.

### *Viscosidade*

A determinação da viscosidade foi realizada seguindo metodologia descrita por Kittiphattanabawon et al. (2005) com modificações. Foram

preparados 500 mL de solução 0,03% (p/v) de colágeno ou hidrolisado, dissolvido em ácido acético 0,1 M. As soluções foram submetidas a medição da viscosidade em viscosímetro *Brookfield* (RV-DV-II +Pro) com haste N° 1 e velocidade de 100 rpm, nas temperaturas de 10, 25 e 50 °C, para controle da temperatura foi utilizado um banho termostatizado (Haake, Fisons F3 C), à cada temperatura designada, a solução foi mantida durante 30 minutos antes da determinação da viscosidade.

#### *Propriedades da Espuma*

A capacidade de formação de espuma (CFE) e a estabilidade da espuma (EE) foram determinadas com base no método de Shahidi *et al.* (1995). Soluções das amostras, com concentração 0,5%, foram agitadas em tubo Falcon (50 mL) utilizando ultra homogeneizador Turrax (Tecnal TE-102 Piracicaba, Brasil) a velocidade de 10.000 rpm para incorporar ar durante 2 minutos a temperatura ambiente (20-25 °C). A CFE foi calculada como a % de aumento de volume baseando-se no volume inicial e após a formação de espuma, conforme a equação:

$$\text{CFE (\%)} = \frac{(V - V_0)}{V_0} \times 100$$

Onde  $V_0$  é o volume antes da agitação (mL) e  $V$  é o volume depois da agitação (mL). A determinação da EEs foi medida através do repouso da amostra à temperatura ambiente, com leitura do volume após intervalos de 3 e 10 minutos, sendo a estabilidade calculada pela equação:

$$\text{EE} = \frac{V_t}{V_0} \times 100$$

Sendo  $V_t$  o volume final de espuma, após cada intervalo de tempo (mL), e  $V_0$  corresponde ao volume inicial da espuma formada (mL).

#### *Propriedades emulsificantes*

Para avaliação do índice de atividade emulsionante (EAI) e do índice de estabilidade da emulsão (ESI) foi seguida metodologia de Pearce e Kinsella (1978). 10 mL de óleo de soja e 30 mL de solução de amostra 0,1% foram misturados em ultra homogeneizador Turrax (Tecnal TE-102 Piracicaba, Brasil) a uma velocidade de 12.000 rpm durante 1 min. Em seguida, uma alíquota da emulsão foi pipetada a partir do fundo do recipiente, a 0 e 10 min após a homogeneização, e diluída 100 vezes utilizando uma solução de SDS (dodecil sulfato de sódio) a 0,1%. A absorvância da solução diluída foi determinada a 500 nm usando um espectrofotômetro (Servylab, UV – M51, B, São Leopoldo, RS, Brasil). As absorvâncias foram utilizadas para calcular o EAI e o ESI com as seguintes equações:

$$\text{EAI} \left( \text{m}^2/\text{g} \right) = \frac{(2 \times 2,303 \times A_0)}{(0,25 \times \text{concentração de colágeno})}$$

$$\text{ESI} (\text{min}) = \frac{A_0 \times 10 \text{ min}}{A_0 - A_{10}}$$

Onde  $A_0$  é a absorvância determinada imediatamente após a formação da emulsão (0 min) e  $A_{10}$  a absorvância determinada 10 min após a formação da emulsão.

### *Análise Estatística*

Para os processos de extração e hidrólise do colágeno foram realizadas três repetições. Todas as análises foram realizadas em triplicata. Os resultados foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e teste de Tukey, com nível de significância de 5% ( $p < 0,05$ ), utilizando Statistica ®8.0 (StatSoft Inc., Tulsa, OK, EUA).

Após a obtenção dos espectros por FTIR, cada espectro foi tratado com a absorvância normalizada entre 0 e 1, suavizada (15 pontos), corrigida na linha de base e removida a zona de CO<sub>2</sub> usando o software Shimadzu IRsolution 1.40. Em seguida, uma tabela com todos os dados foi construída usando o comprimento de onda como coluna e as amostras como linhas, e então, os espectros de FTIR foram confeccionados no aplicativo SAS® - *Statistical Analysis System* versão 9.4 (SAS Institute Inc., Cary - NC, USA).

## **Resultados e discussão**

### *Grau de hidrólise*

O colágeno hidrolisado com enzima Alcalase® apresentou maior grau de hidrólise, 36,11% ( $\pm 0,34$ ), em relação ao colágeno hidrolisado com Flavourzyme®, 12,02% ( $\pm 0,23$ ), indicando que a Alcalase® clivou mais ligações peptídicas do que a Flavourzyme®, originando peptídeos de menor peso molecular, o que é benéfico para aplicações industriais.

Maiores valores de grau de hidrólise também foram obtidos com Alcalase<sup>®</sup>, quando comparada com a Flavourzyme<sup>®</sup>, na hidrólise de proteína de coxas e peito de frango (Schmidt e Salas-Mellado, 2009), tilápia (*Oreochromis niloticus*) (Foh et al., 2010) e Bluewing Searobin (*Prionotus punctatus*) (dos Santos et al. 2011).

Ambas as enzimas possuem temperatura e pH ótimos muito parecidos, no entanto a enzima Alcalase<sup>®</sup> é uma endoprotease serina, e apresenta ampla especificidade de substratos, sendo capaz de hidrolisar a maioria das ligações peptídicas internas de moléculas de proteína (Adler-Nissen, 1986), enquanto, a Flavourzyme<sup>®</sup> contém atividades de endoprotease e exopeptidase (Nilsang et al., 2005), o que lhe garante uma ampla gama de ação.

Porém, estudo de Vaštag et al. (2011), com hidrolisados de isolado proteico de bagaço de abóbora, mostrou um menor grau de hidrólise (37,17%) e a presença de peptídeos de alto e baixo peso molecular em hidrolisados com Flavourzyme<sup>®</sup>, enquanto os hidrolisados com Alcalase<sup>®</sup> apresentaram maior grau de hidrólise (53,23%) e peptídeos de menor peso molecular, indicando que a menor eficácia da enzima Flavourzyme<sup>®</sup> se deve, provavelmente, a sua atividade exopeptidase.

#### *Espectroscopia de Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR)*

A Figura 1 apresenta os espectros de infravermelho do colágeno de resíduo de CMS de frango e dos colágenos hidrolisados com Flavourzyme<sup>®</sup> e Alcalase<sup>®</sup>. O espectro FTIR do colágeno bruto apresentou

picos de absorção característicos, nas regiões das bandas das amidas A e B e I, II e III.

A banda da amida A foi encontrada em  $3325\text{ cm}^{-1}$ , sendo associadas a vibrações de estiramento N-H quando o grupo NH do peptídeo está envolvido numa ligações de hidrogênio (Sai e Babu; 2001). A banda de amida B ( $2924\text{ cm}^{-1}$ ) está relacionada com o alongamento assimétrico da vibração de estiramento de  $\text{CH}_2$  e a absorção devido a cadeia alquila  $\text{CH}_2$  (Hsu et al., 2005). A banda de amida I, com frequências características na gama de  $1600$  a  $1700\text{ cm}^{-1}$ , é associada principalmente às vibrações de estiramento dos grupos carbonila ao longo do esqueleto polipeptídico (Payne e Veis, 1988). As bandas amida II ( $1556\text{ cm}^{-1}$ ) e III ( $1240\text{ cm}^{-1}$ ) representam vibrações de flexão N-H acopladas com vibração de estiramento C-N (Jackson et al. 1995; Payne e Veis, 1988).

Nos espectros FTIR dos colágenos hidrolisados por Alcalase<sup>®</sup> e Flavourzyme<sup>®</sup> a posição das bandas das amidas ficaram praticamente inalteradas, sugerindo que as estruturas secundárias não foram completamente destruídas no processo de hidrólise. Em contrapartida, a área das bandas foram reduzidas, indicando que parte do colágeno foi quebrado em polipeptídios e a conformação helicoidal do colágeno foi parcialmente destruída (Li et al., 2013 B)

O colágeno de resíduo de CMS bruto apresentou uma razão entre o pico da amida III ( $1240\text{ cm}^{-1}$ ) e o pico em  $1450\text{ cm}^{-1}$  muito próximo a 1,0, comprovando a presença da estrutura de tripla hélice, característica dos colágenos (Plepis et al., 1996). Já nos espectros dos hidrolisados o pico

em  $1450\text{ cm}^{-1}$  e da amida III apresentaram intensidade bastante reduzida, sendo praticamente inexistentes no hidrolisado com Alcalase<sup>®</sup>, o que confirma que a estrutura helicoidal tripla do colágeno desapareceu após a hidrólise enzimática. Chi et al. (2014) obtiveram o mesmo resultado na hidrólise de colágenos de pele de cavala espanhola.

Segundo Lacerda et al. (1998) e Bet et al. (2001) a banda em torno de  $1240\text{ cm}^{-1}$  é sensível à alterações na estrutura secundária do tropocolágeno (tripla hélice), enquanto a banda  $1450\text{ cm}^{-1}$  corresponde às vibrações dos anéis pirrolidínicos de prolina e hidroxiprolina.

Em estudo de Bryan et al. (2007), o aquecimento do colágeno, de 12 a  $60\text{ }^{\circ}\text{C}$ , acarretou em diminuição na absorbância e alargamento do pico da amida I, devido a desnaturação do colágeno. Efeito semelhante pode ser observado no espectro FTIR do colágeno hidrolisado com Alcalase<sup>®</sup>.

Ambos os colágenos hidrolisados apresentaram em seu espectro de FTIR o aparecimento de alguns picos de intensidade média em comprimentos de ondas mais baixos, de  $800$  a  $1200\text{ cm}^{-1}$ , que não são observados no espectro do colágeno bruto. Isso indica mudanças estruturais na molécula de colágeno, acarretadas pelo processo de hidrólise e essas alterações são determinantes para as propriedades funcionais dos hidrolisados.

#### *Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC)*

A Figura 2 apresenta os termogramas por DSC para o colágeno de resíduo de CMS de frango e colágenos hidrolisados com Flavourzyme<sup>®</sup> e



Alcalase<sup>®</sup>. No termograma do colágeno bruto (Figura 2a) observou-se uma transição endotérmica em 46,47 °C, correspondente à desnaturação do colágeno, valor próximo ao obtido para pés de codorna, 39,6 °C (Yousefi et al., 2017).

Como era esperado, os termogramas dos colágenos hidrolisados (Figura 2b e 2c) não apresentaram fenômenos de transição térmica, comprovando que a molécula de colágeno foi quebrada em frações menores durante o processo de hidrólise, por ação da enzima e do calor.

#### *Análise de eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE)*

A Figura 3 apresenta o SDS-PAGE para o colágeno de resíduo de CMS de frango e os colágenos hidrolisados por Alcalase<sup>®</sup> e Flavourzyme<sup>®</sup>. No colágeno bruto se observam duas bandas distintas, correspondentes as cadeias  $\alpha_1$  e  $\alpha_2$ , próximo a 125 kDa, indicando que o colágeno de resíduo de CMS é constituído principalmente por colágeno do tipo I. Também foi possível verificar a presença de algumas proteínas de menor peso molecular, entre 100 e 30 kDa.

Nos colágenos hidrolisados com Alcalase<sup>®</sup> e Flavourzyme<sup>®</sup> ocorreu o desaparecimento de todas as bandas de proteínas de peso molecular médio a elevado, restando apenas bandas claras abaixo dos 15 kDa comprovando a hidrólise da molécula de colágeno em peptídeos menores. Apesar da diferença no grau de hidrólise entre os colágenos hidrolisados com Alcalase<sup>®</sup> e Flavourzyme<sup>®</sup> não foram observadas diferenças significativas na distribuição de peso molecular.

Em estudo de Li et al. (2013b) a hidrólise de colágenos de cartilagem de peixes com tripsina em pH neutro acarretou em peptídeos de baixo peso molecular, menores que 20 kDa. A hidrólise de gelatinas de linguado e lula por Alcalase<sup>®</sup> originou hidrolisados com padrão de bandas polipeptídicas abaixo de 30 kDa, sendo ambos os perfis de eletroforese dominados por peptídeos abaixo de 6,5 kDa (Gimenez et al., 2009)

De acordo com Zhang et al. (2006) diferentes processos levam a diferentes distribuições de peso molecular. O colágeno foi extraído com pepsina em meio ácido, que atacou apenas o domínio helicoidal não triplo do colágeno nativo, enquanto os hidrolisados de colágeno foram obtidos em condições mais severas, acima da temperatura de desnaturação. Isso destruiu a estrutura de tripla hélice e parte das ligações peptídicas, acarretando em pesos moleculares mais baixos.

### *Viscosidade*

Os resultados de viscosidade, apresentados na Tabela 1, mostram que esta propriedade foi menor nos colágenos hidrolisados, com Alcalase<sup>®</sup> e Flavourzyme<sup>®</sup>, do que no colágeno de resíduo de CMS bruto, para todas as temperaturas testadas, 10, 25 e 50 °C. De acordo com Zhang et al. (2017), geralmente, as propriedades funcionais dos hidrolisados estão relacionadas ao seu peso molecular e, os hidrolisados de baixo peso molecular normalmente possuem menor viscosidade. Além disso, o espectro FTIR (Figura 1) e a SDS-PAGE (Figura 3) indicaram a desnaturação do colágeno hidrolisado, o que pode acarretar na diminuição

da viscosidade, devido a quebra das ligações de hidrogênio entre as cadeias polipeptídicas adjacentes das moléculas de colágeno, levando a formação de cadeias individuais ( $\alpha$ ) ou dímeros ( $\beta$ ).

Em estudo de Zhang et al. (2006) a viscosidade de gelatina e hidrolisado de colágeno bovino foi bastante inferior, quando comparado com a do colágeno bruto, e também apresentou pouca diminuição com o aumento da temperatura.

De maneira geral, as soluções (0,03%) de colágeno e hidrolisados apresentaram valores elevados de viscosidade, os resultados obtidos foram superiores aos encontrados para gelatinas de escamas de lagarto (*Saurida* spp.), que variaram entre 3,14 a 5,80 cP, para soluções 6,67% a 25 °C (Wangtueai e Noomhorm, 2009) e gelatina de pele de Tilápia (*Oreochromis urolepis hornorum*), que variaram de 2,56 a 6,12 cP, em temperatura de 60 °C (Alfaro et al., 2014).

#### *Propriedades da Espuma*

Os resultados de capacidade de formação de espuma (CFE) e estabilidade da espuma (EE) estão apresentados na Tabela 2, observou-se que o colágeno de resíduo de CMS bruto apresentou maior CFE (22,87%) que os colágenos hidrolisados com Alcalase<sup>®</sup> (3,75%) e Flavourzyme<sup>®</sup> (4,38%). Também, a espuma do colágeno bruto apresentou melhor estabilidade nos tempos testados.

Alguns estudos (Chi et al., 2014; Li et al., 2013b) tem relatado que peptídeos de maior peso molecular são benéficos para a formação de um

filme estável em torno das bolhas de ar, sendo esta, a principal razão para uma melhor capacidade de formação de espuma. A redução da estabilidade da espuma dos hidrolisados em relação ao colágeno bruto pode se dar pelo fato de os peptídeos menores não possuírem a força necessária para manter a espuma estável.

Apesar de baixos, os valores encontrados para CFE dos hidrolisados de colágeno de resíduo de CMS se aproximam aos obtidos para hidrolisados de gelatina de lula e de peixe sole, entre 6 e 7%, para a mesma concentração testada, 0,5% (Giménez et al., 2009).

#### *Propriedades emulsificantes*

Diversos estudos (Chi et al., 2014; Gajanan et al., 2016; Zhang et al., 2017) têm mostrado que, assim como as propriedades da espuma, a formação e estabilidade da emulsão também é afetada a medida que o tamanho dos peptídeos diminui. No entanto, os resultados obtidos para os hidrolisados de colágeno de resíduo de CMS não concordam com estes relatos. Essa discordância pode ser resultado de diferentes composições e distribuições de aminoácidos, e também já foi encontrado por alguns pesquisadores (Pacheco-Aguilar et al., 2008; Baharuddin et al., 2016).

Os resultados (Tabela 2) mostraram que os hidrolisados de colágeno de resíduo de CMS, obtidos com Alcalase<sup>®</sup> e Flavourzyme<sup>®</sup>, apresentaram elevado índice de atividade emulsificante, 130,53 e 126,89 m<sup>2</sup>/g respectivamente, e potencial para serem utilizados como agentes emulsionantes. Chi et al. (2016) também encontraram valores altos de EAI

para hidrolisados de colágeno das cartilagens de *Sphyrna lewini*, *Dasyatis akjei* e *Raja porosa*, 116,07, 91,04 e 123,85 m<sup>2</sup>/g, respectivamente, estes hidrolisados apresentaram pesos moleculares médios elevados.

O colágeno hidrolisado com Alcalase<sup>®</sup> exibiu elevado índice de estabilidade da emulsão, 38,68 min, muito semelhante ao encontrado para gelatina de pele bovina, 39,77 min (Jellouli et al., 2011).

De acordo com Wasswa et al. (2008) a elevada capacidade emulsificante de hidrolisados provavelmente podem ser atribuídos ao aumento da solubilidade proteica, menor peso molecular e maior flexibilidade molecular facilitando assim a difusão da proteína para a interface óleo-água.

## **Conclusão**

O maior grau de hidrólise foi obtido para o hidrolisado por enzima Alcalase<sup>®</sup>, 36,11%, enquanto a Flavourzyme<sup>®</sup> apresentou 12,02%. A DSC do colágeno bruto indicou temperatura de desnaturação em 46,47 °C, e os termogramas dos hidrolisados não apresentaram fenômenos de transição térmica.

As análises de FTIR e SDS-PAGE confirmaram a hidrólise da molécula de colágeno em peptídeos menores. O espectro FTIR do colágeno de resíduo de CMS bruto mostrou picos de absorção característicos das amidas A e B e I, II e III. Nos espectros FTIR de ambos os colágenos hidrolisados a posição das bandas ficaram praticamente inalteradas, no entanto a área das bandas foram reduzidas, além disso,

houve o aparecimento de alguns picos entre 800 a 1200  $\text{cm}^{-1}$ . Na SDS-PAGE houve o desaparecimento de todas as bandas de proteínas de peso molecular médio a elevado, em ambos os hidrolisados.

A hidrólise alterou a funcionalidade do colágeno hidrolisado, que apresentou diminuição da viscosidade e capacidade de formação de espuma e melhora no índice de atividade emulsificante, o hidrolisado com Alcalase<sup>®</sup> exibiu elevada estabilidade da emulsão (38,68 min), mostrando potencial para ser utilizado como agente emulsionante.

Deste modo, a obtenção de hidrolisados a partir de colágeno de resíduo de CMS de frango utilizando as enzimas Alcalase<sup>®</sup> e Flavourzyme<sup>®</sup> se mostrou viável, uma vez que foi comprovada a clivagem do colágeno em peptídeos de menor peso molecular e os hidrolisados apresentaram boa funcionalidade, com potencial para aplicação industrial.

### **Referencias Bibliográficas**

Adler-Nissen, J. 1986. A review of food protein hydrolysis—Specific areas. *Enzymic Hydrolysis of Food Proteins*, Elsevier Applied Science Publishers Ltd., UK 57-107.

Alfaro, A. T., Fonseca, G. G., Balbinot, E., de Souza, N. E. and Prentice, C. 2014. Yield, viscosity, and gel strength of wami tilapia (*Oreochromis urolepis hornorum*) skin gelatin: Optimization of the extraction process. *Food Science and Biotechnology*, 23(3), 765-773.

Associação Brasileira de Proteína Animal (ABPA). Relatório Anual 2017. Retrieved on February 14, 2018, from ABPA Website: <http://abpa->

br.com.br/storage/files/3678c\_final\_abpa\_relatorio\_anual\_2016\_portugues  
\_web\_reduzido.pdf

Baharuddin, N. A., Halim, N. R. A. and Sarbon, N. M. 2016. Effect of degree of hydrolysis (DH) on the functional properties and angiotensin I-converting enzyme (ACE) inhibitory activity of eel (*Monopterus sp.*) protein hydrolysate. *International Food Research Journal*, 23(4), 1424-1431.

Bet, M. R., Goissis, G. and Lacerda, C. A. 2001. Characterization of polyanionic collagen prepared by selective hydrolysis of asparagine and glutamine carboxamide side chains. *Biomacromolecules*, 2(4), 1074-1079.

Bhaskar, N., Modi, V. K., Govindaraju, K., Radha, C. and Lalitha, R. G. 2007. Utilization of meat industry by products: protein hydrolysate from sheep visceral mass. *Bioresource technology*, 98(2), 388-394.

Bryan, M. A., Brauner, J. W., Anderle, G., Flach, C. R., Brodsky, B. and Mendelsohn, R. 2007. FTIR studies of collagen model peptides: complementary experimental and simulation approaches to conformation and unfolding. *Journal of the American Chemical Society*, 129(25), 7877-7884

Chalamaiah, M., Hemalatha, R. and Jyothirmayi, T. 2012. Fish protein hydrolysates: proximate composition, amino acid composition, antioxidant activities and applications: a review. *Food chemistry*, 135(4), 3020-3038.

Chi, C., Hu, F., Li, Z., Wang, B. and Luo, H. 2016. Influence of different hydrolysis processes by trypsin on the physicochemical, antioxidant, and functional properties of collagen hydrolysates from

*Sphyrna lewini*, *Dasyatis akjei*, and *Raja porosa*. Journal of aquatic food product technology, 25(5), 616-632.

Chi, C. F., Cao, Z. H., Wang, B., Hu, F. Y., Li, Z. R. and Zhang, B. 2014. Antioxidant and functional properties of collagen hydrolysates from spanish mackerel skin as influenced by average molecular weight. Molecules, 19(8), 11211-11230.

Cheung, I. W. and Li-Chan, E. C. 2017. Enzymatic production of protein hydrolysates from steelhead (*Oncorhynchus mykiss*) skin gelatin as inhibitors of dipeptidyl-peptidase IV and angiotensin-I converting enzyme. Journal of Functional Foods, 28, 254-264

dos Santos, S. D. A., Martins, V. G., Salas-Mellado, M. and Prentice, C. 2011. Evaluation of functional properties in protein hydrolysates from bluewing searobin (*Prionotus punctatus*) obtained with different microbial enzymes. Food and Bioprocess Technology, 4(8), 1399-1406.

Duan, R., Zhang, J., Du, X., Yao, X. and Konno, K. 2009. Properties of collagen from skin, scale and bone of carp (*Cyprinus carpio*). Food chemistry, 112(3), 702-706.

Farvin, K. S., Andersen, L. L., Otte, J., Nielsen, H. H., Jessen, F. and Jacobsen, C. 2016. Antioxidant activity of cod (*Gadus morhua*) protein hydrolysates: Fractionation and characterisation of peptide fractions. Food chemistry, 204, 409-419.

Foh, M. B. K., Amadou, I., Foh, B. M., Kamara, M. T. and Xia, W. 2010. Functionality and antioxidant properties of tilapia (*Oreochromis*



*niloticus*) as influenced by the degree of hydrolysis. International journal of molecular sciences, 11(4), 1851-1869.

Fu, Y., Young, J. F., Rasmussen, M. K., Dalsgaard, T. K., Lametsch, R., Aluko, R. E. and Therkildsen, M. 2016. Angiotensin I–converting enzyme–inhibitory peptides from bovine collagen: insights into inhibitory mechanism and transepithelial transport. Food Research International, 89, 373-381.

Gajanan, P. G., Elavarasan, K. and Shamasundar, B. A. 2016. Bioactive and functional properties of protein hydrolysates from fish frame processing waste using plant proteases. Environmental Science and Pollution Research, 23(24), 24901-24911.

Giménez, B., Alemán, A., Montero, P. and Gómez-Guillén, M. C. 2009. Antioxidant and functional properties of gelatin hydrolysates obtained from skin of sole and squid. Food Chemistry, 114(3), 976-983.

Halim, N. R. A., Yusof, H. M. and Sarbon, N. M. 2016. Functional and bioactive properties of fish protein hydrolysates and peptides: a comprehensive review. Trends in Food Science e Technology, 51, 24-33.

Hsu, B. L., Weng, Y. M., Liao, Y. H. and Chen, W. 2005. Structural investigation of edible zein films/coatings and directly determining their thickness by FT-Raman spectroscopy. Journal of agricultural and food chemistry, 53(13), 5089-5095.

Jackson, M., Watson, P. H., Halliday, W. C. and Mantsch, H. H. 1995. Beware of connective tissue proteins: assignment and implications of collagen absorptions in infrared spectra of human tissues. Biochimica et

Biophysica Acta (BBA)-Molecular Basis of Disease, 1270(1), 1-6.

Jellouli, K., Balti, R., Bougatef, A., Hmidet, N., Barkia, A. and Nasri, M. 2011. Chemical composition and characteristics of skin gelatin from grey triggerfish (*Balistes capriscus*). LWT-Food Science and Technology, 44(9), 1965-1970.

Jung, W. K., Karawita, R., Heo, S. J., Lee, B. J., Kim, S. K. and Jeon, Y. J. 2006. Recovery of a novel Ca-binding peptide from Alaska Pollack (*Theragra chalcogramma*) backbone by pepsinolytic hydrolysis. Process Biochemistry, 41(9), 2097-2100.

Kittiphattanabawon, P., Benjakul, S., Visessanguan, W. and Shahidi, F. 2010. Isolation and characterization of collagen from the cartilages of brownbanded bamboo shark (*Chiloscyllium punctatum*) and blacktip shark (*Carcharhinus limbatus*). LWT-Food Science and Technology, 43(5), 792-800.

Lacerda, C., Plepis, A. M. G. and Goissis, G. 1998. Hidrólise seletiva de carboxiamidas de resíduos de asparagina e glutamina em colágeno: preparação e caracterização de matrizes aniônicas para uso como biomateriais. Química Nova, 21(3), 267-71.

Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L. and Randall, R. J. 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent. Journal of biological chemistry, 193(1), 265-275.

Li, Z. R., Wang, B., Chi, C. F., Zhang, Q. H., Gong, Y. D., Tang, J. J., Hong, Y. L. and Ding, G. F. 2013 A. Isolation and characterization of acid soluble collagens and pepsin soluble collagens from the skin and bone

of Spanish mackerel (*Scomberomorus niphonius*). Food Hydrocolloids, 31(1), 103-113.

Li, Z., Wang, B., Chi, C., Gong, Y., Luo, H. and Ding, G. 2013 B. Influence of average molecular weight on antioxidant and functional properties of cartilage collagen hydrolysates from *Sphyrna lewini*, *Dasyatis akjei* and *Raja porosa*. Food research international, 51(1), 283-293.

Negrão, C. C., Mizubuti, I. Y., Morita, M. C., Colli, C., Ida, E. I. and Shimokomaki, M. 2005. Biological evaluation of mechanically deboned chicken meat protein quality. Food Chemistry, 90(4), 579-583.

Nilsang, S., Lertsiri, S., Suphantharika, M. and Assavanig, A. 2005. Optimization of enzymatic hydrolysis of fish soluble concentrate by commercial proteases. Journal of food Engineering, 70(4), 571-578.

Pacheco-Aguilar, R., Mazorra-Manzano, M. A. and Ramírez-Suárez, J. C. 2008. Functional properties of fish protein hydrolysates from Pacific whiting (*Merluccius productus*) muscle produced by a commercial protease. Food Chemistry, 109(4), 782-789.

Payne, K. J. and Veis, A. 1988. Fourier transform IR spectroscopy of collagen and gelatin solutions: deconvolution of the amide I band for conformational studies. Biopolymers: Original Research on Biomolecules, 27(11), 1749-1760.

Plepis, A. M. D. G., Goisis, G. and Das-Gupta, D. K. 1996. Dielectric and pyroelectric characterization of anionic and native collagen. Polymer Engineering & Science, 36(24), 2932-2938.

Sai, K. P. and Babu, M. 2001. Studies on *Rana tigerina* skin

collagen. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology*, 128(1), 81-90.

Schmidt, C. G. and Salas-Mellado, M. 2009. Influência da ação das enzimas Alcalase e Flavourzyme no grau de hidrólise das proteínas de carne de frango. *Química Nova*, 32(5), 1144-1150.

Šližyte, R., Daukšas, E., Falch, E., Storrø, I. and Rustad, T. 2005. Yield and composition of different fractions obtained after enzymatic hydrolysis of cod (*Gadus morhua*) by-products. *Process Biochemistry*, 40(3-4), 1415-1424.

Vaštag, Ž., Popović, L., Popović, S., Krimer, V. and Peričin, D. 2011. Production of enzymatic hydrolysates with antioxidant and angiotensin-I converting enzyme inhibitory activity from pumpkin oil cake protein isolate. *Food Chemistry*, 124(4), 1316-1321.

Yousefi, M., Ariffin, F. and Huda, N. 2017. An alternative source of type I collagen based on by-product with higher thermal stability. *Food Hydrocolloids*, 63, 372-382.

Wangtueai, S. and Noomhorm, A. 2009. Processing optimization and characterization of gelatin from lizardfish (*Saurida spp.*) scales. *LWT-Food Science and Technology*, 42(4), 825-834.

Wasswa, J., Tang, J. and Gu, X. 2008. Functional properties of Grass carp (*Ctenopharyngodon idella*), Nile perch (*Lates niloticus*) and Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) skin hydrolysates. *International Journal of Food Properties*, 11(2), 339-350.

Wergedahl, H., Liaset, B., Gudbrandsen, O. A., Lied, E., Espe, M.,

Muna, Z., Mork, S. and Berge, R. K. 2004. Fish protein hydrolysate reduces plasma total cholesterol, increases the proportion of HDL cholesterol, and lowers acyl-CoA: cholesterol acyltransferase activity in liver of Zucker rats. *The Journal of nutrition*, 134(6), 1320-1327.

Zhang, Z., Li, G. and Shi, B. I. 2006. Physicochemical properties of collagen, gelatin and collagen hydrolysate derived from bovine limed split wastes. *Journal-society of leather technologists and chemists*, 90(1), 23.

Zhang, Y., Zhang, Y., Liu, X., Huang, L., Chen, Z. and Cheng, J. 2017. Influence of hydrolysis behaviour and microfluidisation on the functionality and structural properties of collagen hydrolysates. *Food chemistry*, 227, 211-218.

**Tabela 1** – Viscosidade para o colágeno de resíduo de CMS de frango bruto e hidrolisados obtidos com Alcalase® e Flavourzyme®, nas temperaturas de 10, 25 e 50 °C.

Temperatura (°C)	Viscosidade (mPA.s ou cP)		
	Colágeno Bruto	Hidrolisado Alcalase®	Hidrolisado Flavourzyme®
10	14,43 <sup>a</sup> ±0,59	10,30 <sup>b</sup> ±0,24	10,90 <sup>b</sup> ±0,22
25	12,35 <sup>a</sup> ±0,34	9,55 <sup>c</sup> ±0,24	10,25 <sup>b</sup> ±0,13
50	8,83 <sup>a</sup> ±0,56	7,48 <sup>b</sup> ±0,42	8,67 <sup>ab</sup> ±0,60

<sup>a</sup>Médias na mesma linha com letras iguais sobrescritas não diferem significativamente entre si pelo teste de Tukey ( $p > 0,05$ ).

Valores expressos em média ± desvio padrão

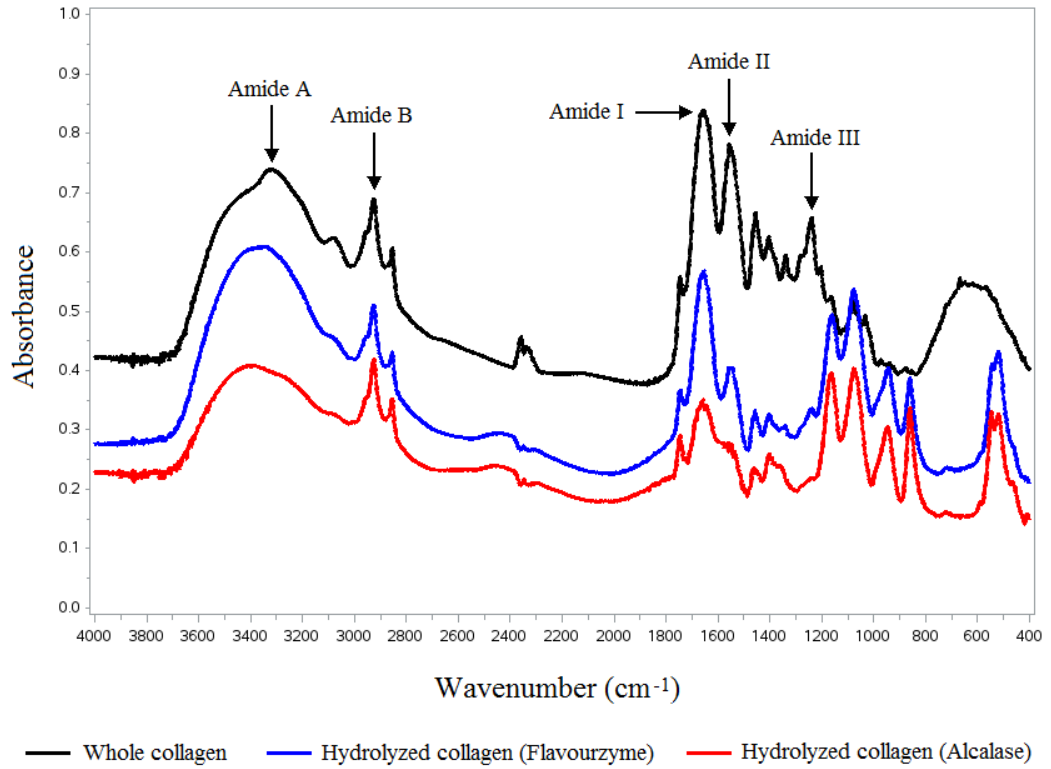
**Tabela 2** - Capacidade de formação de espuma (CFE), estabilidade da espuma (EE), índice de atividade emulsificante (EAI) e índice de estabilidade da emulsão (ESI) para o colágeno de resíduo de CMS de frango bruto e hidrolisados obtidos com Alcalase® e Flavourzyme®.

	CFE (%)	EE (%)		EAI (m <sup>2</sup> /g)	ESI (min)
		3 min	10 min		
<b>Colágeno Bruto</b>	22,87 <sup>a</sup> ± 1,05	90,78 <sup>a</sup>	74,28 <sup>a</sup>	49,01 <sup>b</sup> ± 0,82	14,05 <sup>b</sup> ± 0,86
<b>Hidrolisado Alcalase®</b>	3,75 <sup>b</sup> ± 0,76	63,54 <sup>b</sup>	47,36 <sup>b</sup>	130,53 <sup>a</sup> ± 1,81	38,68 <sup>a</sup> ± 0,79
<b>Hidrolisado Flavourzyme®</b>	4,38 <sup>b</sup> ±0,87	67,43 <sup>b</sup>	45,89 <sup>b</sup>	126,89 <sup>a</sup> ± 1,46	23,62 <sup>b</sup> ± 0,95

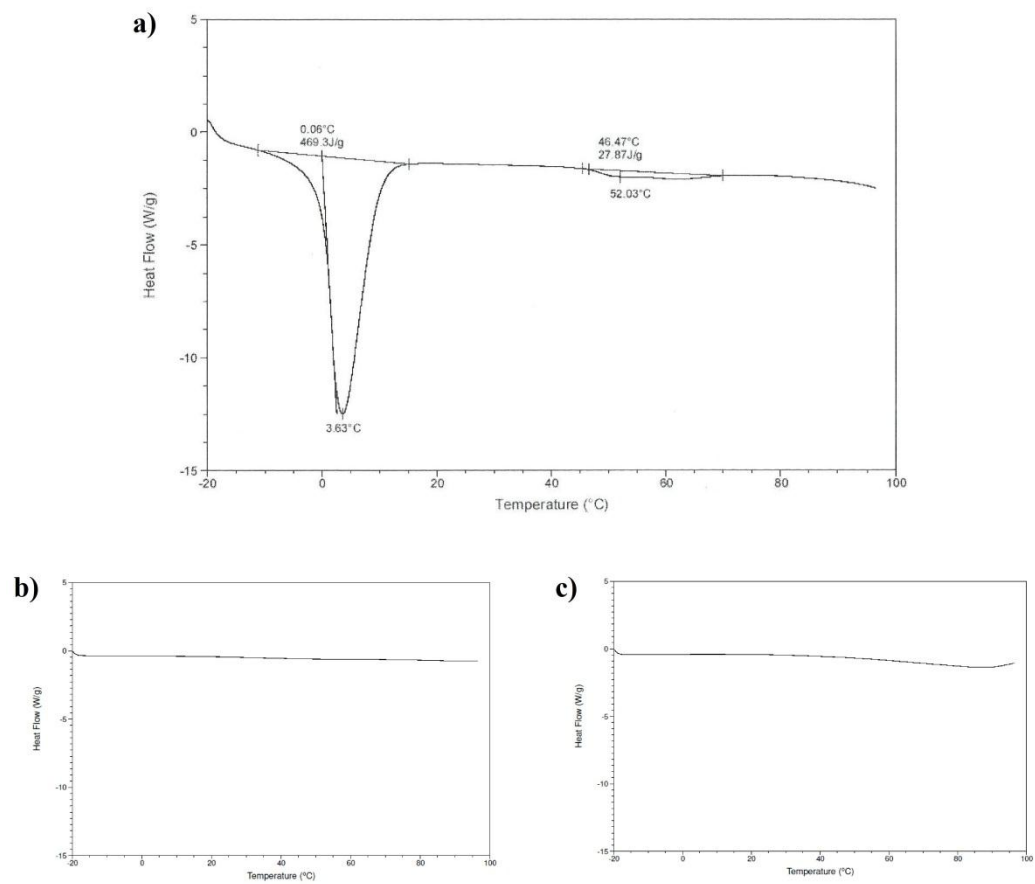
<sup>a</sup>Médias na mesma coluna com letras iguais sobrescritas não diferem significativamente entre si pelo teste de Tukey ( $p > 0,05$ ).

Valores expressos em média ± desvio padrão

**Figura 1** – Espectros de FTIR do colágeno de resíduo de CMS de frango e dos colágenos hidrolisados com Flavourzyme® e Alcalase®.

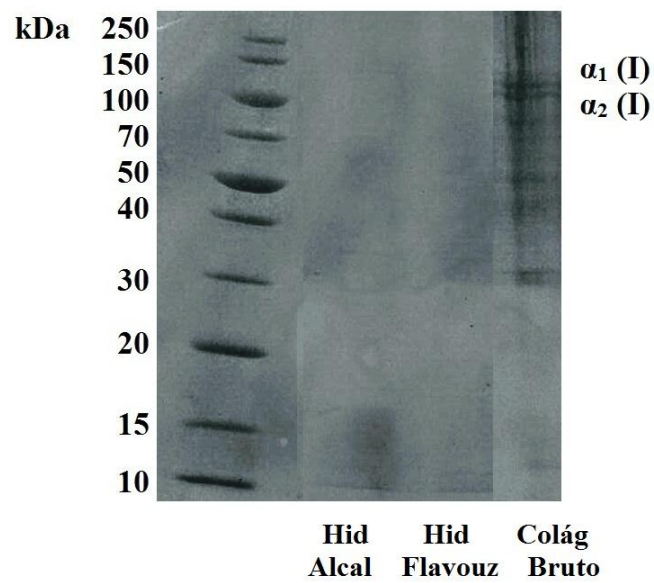


**Figura 2** – Termograma por DSC para (a) colágeno de resíduo de CMS de frango, (b) colágeno hidrolisado por Alcalase<sup>®</sup> e (c) colágeno hidrolisado por Flavourzyme<sup>®</sup>.





**Figura 3** - Eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) do colágeno de resíduo de CMS de frango, colágeno hidrolisado por Alcalase<sup>®</sup> e colágeno hidrolisado por Flavourzyme<sup>®</sup>.



#### 4. DISCUSSÃO GERAL

O Brasil é o segundo maior produtor mundial e o maior exportador de carne de frango, grande parte das carcaças de frango produzidas são transformadas em carne mecanicamente separada (CMS), gerando grande quantidade de resíduo, entre 15 e 45%. O resíduo de CMS contém alto teor de proteínas e colágeno o que o torna uma alternativa promissora para obtenção de hidrolisados proteicos e colágeno, permitindo agregar valor a este resíduo.

O colágeno pode ser obtido basicamente por hidrólise química e/ou hidrólise enzimática (Zavareze *et al.*, 2009). As principais fontes para extração do colágeno comercial são os subprodutos do abate de suínos e bovinos (Jia *et al.*, 2010; da Silva & Penna, 2012). No entanto, diversos estudos têm abordado a obtenção de hidrolisados proteicos e colágeno de diferentes fontes alternativas, como pele de robalo (*Lateolabrax japonicus*) (Kim *et al.*, 2012), pele de Ema (*Dromaius novaehollandiae*) (Nagai *et al.*, 2015), bexiga natatória de atum (*Thunnus albacares*) (Kaewdang *et al.*, 2014), pele e osso de cavala (*Scomberomorus niphonius*) (Li *et al.*, 2013), pés de frango (Hashim *et al.*, 2014), cartilagem de Amur esturjão (*Acipenser schrenckii*) (Liang *et al.*, 2014), pele de frango (Cliche *et al.*, 2003), entre outros.

Apesar da imensa variedade de resíduos já estudados, ainda não existiam na literatura pesquisas utilizando o resíduo de CMS de frango para obtenção de colágeno e hidrolisados proteicos. O presente estudo comprovou que a obtenção de colágeno de resíduo de CMS de frango é viável, exibindo um bom rendimento, 13% em base seca. O uso do ultrassom como pré-tratamento, antecedendo a extração enzimática, ajudou a melhorar esse rendimento, chegando a alcançar um aumento de cerca de 40% no tratamento que recebeu aplicação de ultrassom por 30 minutos, passando de 10,8% para 15,1% (base seca). O maior tempo de extração enzimática também teve efeito positivo sobre o rendimento.

Os colágenos obtidos com e sem o uso do ultrassom apresentaram elevada estabilidade térmica, com temperatura de desnaturação entre 43,91 e 46,96 °C, valor inferior ao conhecido para colágenos suínos e bovinos, entre 60 e 65 °C (Zhao e Chi, 2009), no entanto, superior à maioria dos colágenos de pescados, como pele de Amur esturjão (32,46 °C) (Wang *et al.* 2014), pele de Bacalhau Báltico (15,2 °C), Salmão (20,6 °C) e Catfish africano (29,3 °C) (Tylingo *et al.*, 2016).

A análise de eletroforese em gel de poliacrilamida dos colágenos de resíduo de CMS mostrou claramente as bandas  $\alpha_1(I)$  e  $\alpha_2(I)$ , comprovando que estes são composto principalmente por colágeno do tipo I. Além disso, a SDS-PAGE comprovou a hidrólise do

colágeno pelas enzimas Alcalase<sup>®</sup> e Flavourzyme<sup>®</sup>, pelo desaparecimento das bandas de proteínas presentes no colágeno bruto.

Os colágenos apresentaram espectros FTIR com picos de absorção característicos, situados nas regiões das bandas das amidas A e B e I, II e III, semelhantes aos encontrados para o colágeno de pés de frango (Hashim et al., 2014) e de pele de Ema (Nagai et al., 2015). Nos espectros dos hidrolisados com Alcalase<sup>®</sup> e Flavourzyme<sup>®</sup> a posição das bandas ficaram praticamente inalteradas, no entanto suas áreas foram reduzidas, indicando que parte do colágeno foi quebrado em polipeptídios menores (Li et al., 2013).

Os espectros de todos os colágenos apresentaram razão entre a área do pico da amida III e o pico em  $1454\text{ cm}^{-1}$  próxima a 1,0, indicando que a estrutura de tripla hélice não foi afetada pelo uso do ultrassom e da pepsina (Wang et al., 2014). Enquanto que nos espectros dos hidrolisados os picos apresentaram intensidade bastante reduzida, o que confirma que a estrutura helicoidal tripla do colágeno desapareceu após a hidrólise enzimática. Chi et al. (2014) obteve o mesmo resultado na hidrólise de colágenos de pele de cavala espanhola.

Quanto as propriedades funcionais, observou-se que o colágeno de resíduo de CMS bruto apresentou maior capacidade de formação (22,87%) e estabilidade da espuma que os colágenos hidrolisados com Alcalase<sup>®</sup> e Flavourzyme<sup>®</sup>, devido a peptídeos de maior peso molecular serem benéficos para a formação de um filme estável em torno das bolhas de ar (Chi et al., 2014; Li et al., 2013).

O colágeno de resíduo de CMS apresentou índice de atividade emulsificante (49,27  $\text{m}^2/\text{g}$ ) superior ao da gelatina de pele bovina e de pele de Grey triggerfish (Jellouli et al., 2011), e esse índice foi ainda maior após a hidrólise, 130,53  $\text{m}^2/\text{g}$  para o hidrolisado com Alcalase<sup>®</sup> e 126,89  $\text{m}^2/\text{g}$  para Flavourzyme<sup>®</sup>, ambos apresentam potencial como agentes emulsificantes.

A viscosidade da solução de colágeno de resíduo de CMS de frango 0,03% (p/v) apresentou diminuição significativa com o aumento da temperatura (10 a 50 °C), de 14,57 a 8,80 mPa.s. Ambos os colágenos hidrolisados exibiram menor viscosidade que o colágeno bruto, para todas as temperaturas testadas, 10, 25 e 50 °C. De acordo com Zhang et al. (2017), geralmente, os hidrolisados de baixo peso molecular possuem menor viscosidade.

O presente estudo comprovou que o resíduo de CMS de frango é uma fonte tecnologicamente viável para extração de colágeno, e este colágeno pode ser uma alternativa promissora aos colágenos convencionais. A obtenção de hidrolisados a partir do colágeno de resíduo de CMS também se mostrou possível.

## 5. SUGESTÕES DE TRABALHOS FUTUROS

Sugerimos como trabalhos futuros a otimização do método de extração do colágeno de resíduo de CMS de frango, com o objetivo de melhorar ainda mais o rendimento e diminuir o tempo de processo, e também a otimização do pré-tratamento realizado na matéria-prima, visando diminuir o tempo gasto nesta etapa.

Aplicar os hidrolisados de colágeno de resíduo de CMS, obtidos com Alcalase<sup>®</sup> e Flavourzyme<sup>®</sup>, em produtos alimentícios a fim de avaliar as propriedades funcionais apresentadas neste trabalho.

Testar o efeito de outras enzimas na hidrólise do colágeno e realizar o fracionamento destes colágenos hidrolisados, também avaliar os hidrolisados e suas frações quanto a atividade antioxidante, antimicrobiana e atividade contra a enzima conversora da angiotensina-I (ECA-I), que avalia a capacidade anti-hipertensiva.

## 6. CONCLUSÃO

O resíduo de CMS de frango comprovou ser uma fonte tecnologicamente viável para extração de colágeno, tornando possível agregar valor aos resíduos gerados na elaboração da CMS, uma vez que o colágeno exibiu bom rendimento, elevada estabilidade térmica, estrutura helicoidal conservada e boa funcionalidade.

A aplicação de pré-tratamento ultrassônico acarretou em aumento de rendimento de colágeno em torno de 40%, o tempo de extração com pepsina também apresentou efeito positivo no rendimento. Não houve danos a integridade do colágeno.

Foi possível a obtenção de hidrolisados de colágeno utilizando as enzimas Alcalase<sup>®</sup> e Flavourzyme<sup>®</sup>, a hidrólise afetou a funcionalidade do colágeno hidrolisado, fator importante para aplicações futurindustriais.

Desta forma, o colágeno de resíduo de CMS de frango se mostrou promissor como alternativa aos colágenos convencionais e a obtenção de hidrolisados a partir deste colágeno se mostrou viável. Tanto o colágeno quanto os hidrolisados apresentam potencial para aplicação industrial.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABPA. Associação Brasileira de Proteína Animal. Relatório Anual 2016. <http://www.abpa-br.com.br>.

BAO, Z. J., ZHAO, Y., WANG, X. Y., CHI, Y. J. Effects of degree of hydrolysis (DH) on the functional properties of egg yolk hydrolysate with alcalase. **Journal of food science and technology**, v. 54, n. 3, p. 669-678, 2017.

BERNARDINI, R.D.; MULLEN, A.M.; BOLTON, D.; KERRY, J.; O'NEILL, E.; HAYES, M. Assessment of the aniotensin-I-converting enzyme (ACE-I) inhibitory and antioxidant activities of hydrolysates of bovine brisket sarcoplasmatic proteins produced by papain and characterization of associate bioactive peptidic fractions. **Meat Science**, v.90, p.226-235, 2012.

BHASKAR, N., MODI, V. K., GOVINDARAJU, K., RADHA, C. AND LALITHA, R. G. Utilization of meat industry by products: protein hydrolysate from sheep visceral mass. **Bioresource technology**, v. 98, n. 2, p. 388-394, 2007.

CHALAMAIAH, M., HEMALATHA, R., JYOTHIRMAYI. Fish protein hydrolysates: proximate composition, amino acid composition, antioxidant activities and applications: a review. **Food chemistry**, v. 135, n. 4, p. 3020-3038, 2012.

CHEMAT, F.; KHAN, M.K. Applications of ultrasound in food technology: processing, preservation and extraction. **Ultrasonic Sonochemistry** v.18, p.813–835, 2011.

CHI, C. F.; CAO, Z. H.; WANG, B.; HU, F. Y.; LI, Z. R.; ZHANG, B. Antioxidant and functional properties of collagen hydrolysates from spanish mackerel skin as influenced by average molecular weight. **Molecules** v.19, v.8, p.11211-11230, 2014.

CHI, C., HU, F., LI, Z., WANG, B., LUO, H. Influence of different hydrolysis processes by trypsin on the physicochemical, antioxidant, and functional properties of collagen hydrolysates from *Sphyrna lewini*, *Dasyatis akjei*, and *Raja porosa*. **Journal of aquatic food product technology**, v. 25, n. 5, p. 616-632, 2016.

CLICHE, S.; AMIOT, J.; AVEZARD, C.; GARIEPY, C. Extraction and characterization of collagen with or without telopeptides from chicken skin. **Poultry Science** v.82, n.3, p.503-509, 2003.

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

DAMODARAN S., PARKIN, K., FENNEMA, O.R. Química de alimentos de fennema. p. 726-730. 4ª ed. São Paulo: Artmed, 2010.

dos SANTOS, S. D. A., MARTINS, V. G., SALAS-MELLADO, M., PRENTICE, C. Evaluation of functional properties in protein hydrolysates from bluewing searobin (*Prionotus punctatus*) obtained with different microbial enzymes. **Food and Bioprocess Technology**, v. 4, n. 8, p. 1399-1406, 2011.

FU, Y., YOUNG, J. F., RASMUSSEN, M. K., DALSGAARD, T. K., LAMETSCH, R., ALUKO, R. E., THERKILDSEN, M. Angiotensin I-converting enzyme-inhibitory peptides from bovine collagen: insights into inhibitory mechanism and transepithelial transport. **Food Research International**, v. 89, p. 373-381, 2016.

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

HASHIM, P.; RIDZWAN, M.M.; BAKAR, J. Isolation and characterization of collagen from chicken feet. **International Journal of Biological, Veterinary, Agricultural and Food Engineering** v.8, n.3, p. 242-246, 2014.

HU, H.; FAN, X.; ZHOU, Z.; XU, X.; DAN, G.; WANG, L.; HUANG, X. ; PAN, S. ; ZHU, L. Acid-induced gelation behavior of soybean protein isolate with high intensity ultrasonic pre-treatments. **Ultrasonic Sonochemistry**, v.20, p.187-195, 2013.

JELLOULI, K.; BALTI, R.; BOUGATEF, A.; HMIDET, N.; BARKIA, A.; NASRI, M. Chemical composition and characteristics of skin gelatin from grey triggerfish (*Balistes capriscus*). **LWT-Food Science and Technology**, v.44, n.9, p.1965-1970, 2011.

JIA, J.; ZHOU, Y.; LU, J.; CHEN, A.; LI, Y.; ZHENG, G. Enzymatic hydrolysis of Alaska pollack (*Theragra chalcogramma*) skin and antioxidant activity of the resulting hydrolysate. **Journal of the Science of Food and Agriculture** v.90, n.4, p. 635-640, 2010.

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

KARIM, A.A.; BHAT, R. Fish gelatin: properties, challenges, and prospects as an alternative to mammalian gelatins. **Food Hydrocolloids**, v.23, p.563-576, 2009.

KIM, S.K.; BYUN, H.G.; PARK, P.J.; SHAHIDI, F. Angiotensin I-converting enzyme inhibitory peptides purified from bovine skin gelatin hydrolysate. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.49, p.2992-2997, 2001.

KIM, S.E.; MENDIS, E. Bioactive compounds from marine processing byproducts – a review. **Food Research International**, v.39, p.383-393, 2006.

KIM, H.K., KIM, Y.H., KIM, Y.J., PARK, H.J., LEE, N.H. Effects of ultrasonic treatment on collagen extraction from skins of the sea bass *Lateolabrax japonicus*. **Fisheries Science**, v.78, n.2, p.485-490, 2012.

KHAN, M.I.; ARSHAD, M.S.; ANJUM, F.M.; SAMEEN, A.; REHMAN, A.; GILL, W. Meat as a functional food with special reference to probiotic sausages. **Food Research International**, v.44. p.3125-3133, 2011.

KITTIPHATTANABAWON, P.; BENJAKUL, S.; VISESSANGUAN, W., SHAHIDI, F. Isolation and characterization of collagen from the cartilages of brownbanded bamboo shark

(*Chiloscyllium punctatum*) and blacktip shark (*Carcharhinus limbatus*). **Food Science and Technology**, v.43, p.792-800, 2010.

LI, B.; CHEN, F.; XANG, X.; JI, B.; WU, Y. Isolation and identification of antioxidative peptides from porcine collagen hydrolysate by consecutive chromatography and eletrospray ionization-mass spectrometry. **Food Chemistry**, v.102, p.1135-1143, 2007.

LI, D.; MU, C.; CAI, S.; LIN, W. Ultrasonic irradiation in the enzymatic extraction of collagen. **Ultrasonic Sonochemistry**, v.16, p.605-609, 2009.

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

LIANG, Q.; WANG, L.; SUN, W.; WANG, Z.; XU, J.; MA, H. Isolation and characterization of collagen from the cartilage of Amur sturgeon (*Acipenser schrenckii*). **Process Biochemistry** v.49, n.2, p.318-323, 2014.

LIN, L.; LV, S.; LI, B. Angiotensin-I-converting enzyme (ACE)-inhibitory and antihypertensive properties of squid skin gelatin hydrolysates. **Food Chemistry**, v.131, p. 225-230, 2012.

MAPA. Ministério da Agricultura e Abastecimento. Secretaria de Defesa Agropecuária. Regulamento técnico para fixação de identidade e qualidade de carne mecanicamente separada (CMS) de aves, bovinos e suínos. **Diário Oficial**, 05 abr. 2000. p.6-7. Instrução Normativa, 4, Anexo 1.

MARTINS, V. G.; COSTA, J. A. V.; HERNANDEZ, C. P. Hidrolisado protéico de pescado obtido por vias química e enzimática a partir de corvina. **Química Nova**, v.32, n.1, p.61-66, 2009.

de MORAES, M. C.; CUNHA, R. L. Gelation property and water holding capacity of heat-treated collagen at different temperature and pH values. **Food research international**, v.50, n.1, p.213-223, 2013.

NAGAI, T., TANOUE, Y., KAI, N., SUZUKI, N. Characterization of collagen from emu (*Dromaius novaehollandiae*) skins. **Journal of Food Science and Technology**, v.52, n.4 p.2344-2351, 2015.

NEGRÃO, C.C., MIZUBUTI, I.Y., MORITA, M.C., COLLI, C., IDA, E.I., SHIMOKOMAKI, M. Biological evaluation of mechanically deboned chicken meat protein quality. **Food Chemistry**, v.90, n.4, p.579-83, 2005.

NELSON, D.L., COX, M.M. Lehninger. Principles of Biochemistry. 4 ed. New York: W. H. Freeman. 1119 p, 2005.

OLIVO, R. O Mundo do Frango - Cadeia Produtiva da Carne de Frango. Criciúma, Ed. Varela, 2006, 680p.

PRESTES, R.C. Colágeno e seus derivados: características e aplicações em produtos cárneos. **Revista Unopar Científica Ciências Biológicas e da Saúde**, v.15, n.1, p.65-74, 2013.

RAN, X. G.; WANG, L. Y. Use of ultrasonic and pepsin treatment in tandem for collagen extraction from meat industry by-products. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 94, n. 3, p. 585-590, 2014.

SANTOS, M.H.; SILVA, R.M.; DUMONT, V.C., NEVES, J.S., MANSUR, H.S., HENEINE, L.G.D. Extraction and characterization of highly purified collagen from bovine pericardium for potencial bioengineering applications. **Materials Science and Engineering C**. v.33, p.790-800, 2013.

SCHMIDT, C.G.; SALLAS-MELLADO, M. Influência da ação das enzimas alcalase e flavourzyme no grau de hidrólise das proteínas de carne de frango. **Química Nova**, v.32, n.5, p.1144-1150, 2009.

SCHRIEBER, R.; GAREIS, H. **Gelatine Handbook: Theory and Industry Practice**. Hardcover, 371p. 2007.

SINTHUSAMRAN, S.; BENJAKUL, S.; KISHIMURA, H. Characteristics and gel properties of gelatin from skin of seabass (*Lates calcarifer*) as influenced by extraction conditions. **Food Chemistry**, v.152, p.276–284, 2014.

SIVAKUMAR, V.; SWAMINATHAN, G.; RAO, P.G.; MURALIDHARAN, C.; MANDAL, A.B.; RAMASAMI, T. Use of ultrasound in leather processing Industry: Effect of sonication on substrate and substances – New insights. **Ultrasonics Sonochemistry**, v.17, n.6, p.1054-1059, 2010.

SIVAKUMAR, V.; RAO, P.G. Studies on the use of Power ultrasound in leather dyeing. **Ultrasonic Sonochemistry**, v.10, p.85-94, 2003.

TYLINGO, R.; MANIA, S.; PANEK, A. Isolation and Characterization of Acid Soluble Collagen from the Skin of African Catfish (*Clarias gariepinus*), Salmon (*Salmo salar*) and Baltic Cod (*Gadus morhua*). **Journal of Biotechnology Biomaterial** v.6, p.1-6, 2016.

WANG, L.; LIANG, Q.; WANG, Z.; XU, J.; LIU, Y.; MA, H. Preparation and characterization of type I collagens from skin of Amur sturgeon (*Acipenser schrenckii*). **Food Chemistry**, v.148, p.410-414, 2014.

WARD, A.G., COURTS, A. *The Science and Technology of Gelatin – A Series of Monographs*. London: Academic Press, 1977.

WEBSTER, J.D.; LEDWARD, D.A.; LAWRIE, R.A. Protein hydrolysates from meat industry by-products. **Meat Science**, v.7, p.147-157, 1982.

YANG, J. I., HO, H. Y., CHU, Y. J., CHOW, C. J. Characteristic and antioxidant activity of retorted gelatin hydrolysates from cobia (*Rachycentron canadum*) skin. **Food chemistry**, v. 110, n. 1, p. 128-136, 2008.



ZAVAREZE, E.R.; SILVA, C.M.; MELLADO, M.S.; PRENTICE-HERNÁNDEZ, C. Funcionalidade de hidrolisados proteicos de cabrinha (*Prionotus punctatus*) obtidos a partir de diferentes proteases microbianas. **Química Nova**, v.32, n.7, p.1739-1743, 2009.

ZHANG, J.; DUAN, R.; HUANG, L. SONG, Y., REGENSTEIN, J.M. Characterization of acid-soluble and pepsin-solubilised collagen from jellyfish (*Cyanea nozakii Kishinouye*). **Food Chemistry**, v.150, p.22-26, 2014.

ZHANG, Y.; ZHANG, Y.; LIU, X.; HUANG, L.; CHEN, Z.; CHENG, J. Influence of hydrolysis behaviour and microfluidisation on the functionality and structural properties of collagen hydrolysates. **Food chemistry**, v.227, p.211-218, 2017.

ZHAO, Y. H.; CHI Y. J. Characterization of collagen from eggshell membrane. **Biotechnology** v.8, p.254-258, 2009.

ZHONG-RUI, L.; WANG, B.; CHANG-FENG, C.; QI-HONG, Z.; YAND-DAN G., JIA-JIA, T., HONG-YU, L., GUO-FANG, D. Isolation and characterization of acid soluble collagens and pepsin soluble collagens from the skin and bone of Spanish mackerel (*Scomberomorus niphonius*). **Food Hydrocolloids**, v.31, p.103-113, 2013.

ZHOU, C.; LI, Y.; YU, X.; YANG, H.; MA, H.; YAGOUB, A. E. A.; CHENG, Y.; HU, J.; OTU, P. N. Y. Extraction and characterization of chicken feet soluble collagen. **LWT-Food Science and Technology**, v. 74, p. 145-153, 2016.

ZOU, Y.; WANG, L.; CAI, P.; LI, P.; ZHANG, M.; SUN, Z.; SUN, C.; XU, W.; WANG, D. Effect of ultrasound assisted extraction on the physicochemical and functional properties of collagen from soft-shelled turtle calipash. **International Journal of Biological Macromolecules**. 2017 (In Press, Corrected Proof)



## Mini Review

## Collagen extraction process

<sup>1</sup>Schmidt, M. M., <sup>1\*</sup>Dornelles, R. C. P., <sup>1</sup>Mello, R. O., <sup>1</sup>Kubota, E. H., <sup>2</sup>Mazutti, M. A., <sup>3</sup>Kempka, A. P. and <sup>4</sup>Demiato, I. M.

<sup>1</sup>Department of Technology and Food Science, Federal University of Santa Maria, Santa Maria, RS, Brazil.

<sup>2</sup>Department of Chemical Engineering, Federal University of Santa Maria, Santa Maria, RS, Brazil.

<sup>3</sup>Department of Food Engineering, State University of Santa Catarina (UDESC), Pinhalzinho, SC, Brazil.

<sup>4</sup>State University of Ponta Grossa (UEPG), Graduate Program in Food Science and Technology (PPGCTA), Ponta Grossa, PR, Brazil.

**Article history**

Received: 18 March 2015

Received in revised form:

30 September 2015

Accepted: 13 November 2015

**Keywords**

Hydrolysis  
Proteases  
Ultrasound  
By-products

**Abstract**

Collagen is a fibrous protein which is dominant in the connective tissue of animals; it has a wide range of applications in the food, pharmaceutical, cosmetic and photographic industries, among others. There is a growing interest in the extraction process of collagen and its derivatives due to the growing tendency to use this protein to replace synthetic agents in various industrial processes, which results in a greater appreciation of the by-products from animal slaughter. Collagen's characteristics depend on the raw material and the extraction conditions, which subsequently determine its application. The most commonly used extraction methods are based on the solubility of collagen in neutral saline solutions, acid solutions, and acid solutions with added enzymes. Recently, the use of ultrasound, combined with these traditional processes, has proven effective in increasing the extraction yield. The objective of this review is to address the different collagen extraction processes, from raw materials to the use of combinations of chemical and enzymatic processes, as well as the use of ultrasound. The information outlined in this article have been collected from different national and international journals in Agricultural Sciences e Science and Food Technology, using four bibliographic databases and also some books of renowned authors. Were selected articles published between 2000 and 2015, to address the different collagen extraction processes have been studied.

© All Rights Reserved

**Introduction**

Collagen is the dominant protein in connective tissue, and it is found in various forms in tissues of all species of multicellular organisms; it exercises various functions, depending on its location (Shimokomaki *et al.*, 2006; Damoradan *et al.*, 2010). It can be extracted from various animal species and it is generally derived from slaughter by-products. The main sources of collagen are the skin, tendons, cartilage and bones. Some studies have addressed ways of obtaining collagen from different animal sources, such as fish and birds, as alternatives to bovine collagen because of the risk of bovine spongiform encephalopathy (Kawwdang *et al.*, 2014; Wang *et al.*, 2014), and also as an alternative to collagen derived from pigs for use in Muslim countries.

There is growing interest in the processes used to extract collagen and its derivatives due to the growing tendency to use this protein in place of synthetic agents in various industrial processes, and also to

provide a greater appreciation of the by-products of animal slaughter (Karim and Bhat, 2008; Gómez-Guillén *et al.*, 2011).

The distribution of molar mass, structure and composition, and the subsequent functional features and properties of collagen, depend on the processing conditions of the raw materials from which it is derived and the specificity of the enzyme used in the extraction process (Prestes, 2013). Thus, it is necessary to determine the appropriate extraction process for each raw material in order to obtain the best performance and the best collagen characteristics for the desired application.

Collagen is considered to be one of the most useful biomaterials because it has a wide range of industrial applications (Lafarga and Hayes, 2014). There is great demand in the food industry for collagen and gelatin because of their high protein content and their functional properties, such as water absorption capacity, gel formation, and the ability to form and stabilize emulsions. In the biomedical

\*Corresponding author.

Email: [rosacrisprestesdornelles@outlook.com](mailto:rosacrisprestesdornelles@outlook.com)

Tel: +55 55 32208254