

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

Andrine Menna da Fontoura

**COLÁGENO DE TILÁPIA: UMA ALTERNATIVA PARA  
AGREGAR VALOR AOS SUBPRODUTOS DA INDÚSTRIA DE  
PESCADO**

Santa Maria, RS  
2019

**Andrine Menna da Fontoura**

**COLÁGENO DE TILÁPIA: UMA ALTERNATIVA PARA AGREGAR VALOR AOS  
SUBPRODUTOS DA INDÚSTRIA DE PESCADO**

Dissertação apresentada ao Curso 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 **Mestre em Ciência e Tecnologia dos Alimentos**.

Orientadora: Prof<sup>o</sup> Dr<sup>a</sup>. Rosa Cristina Prestes Dornelles

Co-orientador: Prof<sup>a</sup> Dr. Ernesto Hashime Kubota

**Santa Maria, RS, Brasil  
2019**

Fontoura, Andrine Menna  
COLÁGENO DE TILÁPIA: UMA ALTERNATIVA PARA AGREGAR  
VALOR AOS SUBPRODUTOS DA INDÚSTRIA DE PESCADO / Andrine  
Menna Fontoura.- 2019.  
95 p.; 30 cm

Orientadora: Rosa Cristina Prestes Dornelles  
Coorientador: Ernesto Hashime Kubota  
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa  
Maria, Centro de Ciências Rurais, Programa de Pós  
Graduação em Ciência e Tecnologia dos Alimentos, RS, 2019

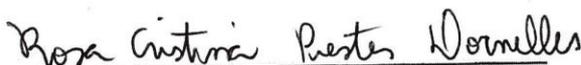
1. Resíduos do processamento da indústria de pescado  
2. Colágeno 3. Eletroforese 4. FTIR I. Prestes  
Dornelles, Rosa Cristina II. Hashime Kubota, Ernesto  
III. Título.

**Andrine Menna da Fontoura**

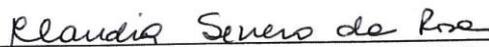
**COLÁGENO DE TILÁPIA: UMA ALTERNATIVA PARA AGREGAR VALOR AOS  
SUBPRODUTOS DA INDÚSTRIA DE PESCADO**

Dissertação apresentada ao Curso 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 **Mestre em Ciência e Tecnologia dos Alimentos**.

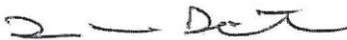
**Aprovado em 27 de fevereiro de 2019:**



**Rosa Cristina Prestes Dornelles, Dr.<sup>a</sup>**  
(Presidente/Orientador)



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



**Ivo Mottin Demiate, Dr. (UEPG)**

Santa Maria, RS

2019

*Aos meus amados pais Jairo  
e Gislaine, pelo amor,  
carinho e compreensão.*

## AGRADECIMENTOS

Neste momento em que a emoção e a felicidade tomam conta, a única palavra que me resta é GRATIDÃO.

Primeiramente eu gostaria de agradecer a Deus, pela sua generosidade de ter me dado uma nova chance de viver e ter colocado em meu caminho pessoas sensacionais.

Aos meus queridos pais e heróis, Jairo e Gislaine, por sempre me apoiarem, por segurem minha mão nos momentos mais difíceis, por nunca terem desistido de mim e principalmente pelo o amor, carinho e compreensão que tiveram até hoje. Eu amo vocês!

Ao meu irmão Alison, por sempre me cuidar, se preocupar, por todo carinho e amor. Tu és única herança que eu tenho na vida. Te amo!

A minha companheira Patrícia, sou grata por ter te encontrado, obrigada pelas viagens, pelos abraços apertados, pelo amor, amizade, carinho e pela compreensão nesses últimos meses.

Agradeço a minha orientadora, amiga e professora Rosa Cristina Prestes Dornelles, por compartilhar comigo seus conhecimentos, pelas orientações, paciência e principalmente pela confiança. Obrigada!

Ao professor Dr. Ernesto Kubota pela paciência e humildade de compartilhar seus conhecimentos.

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

As minhas estagiárias e amigas Fernanda e Laura, pelos dias quentes e frios, pela alegria compartilhada, paciência e companheirismo, sem palavras para agradecer-las.

Aos professores e funcionários do DTCA pela dedicação, ajuda e pelos ensinamentos transmitidos durante essa jornada, em especial a Dona Marialene, Seu Moisés e ao Magé, grandes amigos e parceiros.

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 e viscosidade. Ao professor Dr. Rogério Cansian, seus alunos e a URI, pela generosidade de ter nos emprestado seu laboratório.

Aos meus colegas e amigos de pós-graduação Alisson, Rafaela e Stefania, pela amizade, companheirismo, festas e viagens. Muito obrigada!

Aos meus amigos que moram longe, que a distância e a saudade nos acompanharam nesses dias, meses e anos, a amizade que permaneceu mesmo a quilômetros, obrigada por sempre me esperarem de braços abertos e por sempre torcerem por mim.

A todas as pessoas que eu conheci durante essa jornada, os amigos que fiz, os aprendizados que obtive, o crescimento pessoal e profissional, a todos aqueles que se passaram durante esses dois anos, meu muito obrigada.

A todos aqueles que partiram deixando saudade, obrigada por cuidarem de mim.

A empresa Copacol pela doação da matéria-prima.

A CAPES pela bolsa de mestrado.

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

*“Construí amigos, enfrentei derrotas,  
venci obstáculos, bati na porta da vida  
e disse-lhe: Não tenho medo de vivê-  
la.” (Augusto Cury)*

## RESUMO

### COLÁGENO DE TILÁPIA: UMA ALTERNATIVA PARA AGREGAR VALOR AOS SUBPRODUTOS DA INDÚSTRIA DE PESCADOS

AUTORA: Andrine Menna da Fontoura  
ORIENTADORA: Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup>. Rosa Cristina Prestes Dornelles  
CO-ORIENTADOR: Prof. Dr. Ernesto Hashime Kubota

Os resíduos do processamento da tilápia podem chegar até 70% da matéria-prima, devido o alto teor de proteínas. A obtenção de colágeno é uma alternativa promissora para agregar valor a estes resíduos. Os métodos de obtenção de colágeno baseiam-se na hidrólise química e/ou enzimática. Diante deste contexto, este estudo teve por objetivo a obtenção de colágeno a partir de resíduos da tilápia (carcaça, resíduo de carcaça e pele) através de hidrólise química-enzimática. Os colágenos obtidos dos resíduos do processamento da tilápia foram extraídos com pepsina e obtiveram um bom rendimento (%) a estrutura helicoidal tripla foi preservada, o que pode ser confirmado pelas análises de eletroforese (SDS-PAGE) e espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier (FTIR), sendo os colágenos obtidos constituídos principalmente por colágeno do tipo I. Quanto a funcionalidade, os colágenos apresentaram solubilidade elevada em pH ácido e baixa solubilidade em pH elevado, o índice de atividade emulsificante foi superior a gelatinas convencionais. Os pré-tratamentos com e sem peróxido de hidrogênio não mostraram diferença significativas ( $p < 0,05$ ) na composição centesimal e na funcionalidade dos colágenos. O tempo de extração química-enzimática com pepsina apresentou um efeito positivo sobre o rendimento do colágeno sem afetar sua integridade. Pode-se concluir que os resíduos gerados pelo processamento da indústria comprovaram ser uma fonte tecnologicamente viável para extração de colágeno e, os colágenos destes resíduos se mostraram promissores como alternativa aos colágenos tradicionais, com grande potencial de aplicação industrial.

**Palavras-chave:** Colágeno; Pescado; FTIR; SDS-PAGE; Pepsina; Propriedades.

## ABSTRACT

### TILAPIA COLLAGEN: AN ALTERNATIVE TO ADD VALUE TO THE FISH INDUSTRY BYPRODUCTS

AUTHOR: Andrine Menna da Fontoura

SUPERVISOR: Prof<sup>ª</sup> Dr<sup>ª</sup>. Rosa Cristina Prestes Dornelles

SUPERVISOR: Prof. Dr. Ernesto Hashime Kubota

Tilapia processing residues can reach up to 70% of the raw material, due to the high protein content. Obtaining collagen is a promising alternative to add value to these wastes. The methods of obtaining collagen are based on chemical and / or enzymatic hydrolysis. In this context, the objective of this study was to obtain collagen from tilapia residues (carcass, carcass residue and skin) through chemical-enzymatic hydrolysis. The collagens obtained from the processing residues of the tilapia were extracted with pepsin and obtained a good yield (%) the triple helical structure was preserved, which can be confirmed by electrophoresis analysis (SDS-PAGE) and Fourier transform infrared spectroscopy (FTIR). The collagens were mainly composed of type I collagen. As for functionality, the collagens showed high solubility in acid pH and low solubility at high pH, the emulsifying activity index was superior to conventional gelatins. Pretreatment with and without hydrogen peroxide showed no significant difference ( $p < 0.05$ ) in the centesimal composition and collagen functionality. The time of chemical-enzymatic extraction with pepsin had a positive effect on the yield of collagen without affecting its integrity. It can be concluded that the residues generated by the processing of the industry have proven to be a technologically viable source for the extraction of collagen and the collagens of these residues have shown to be promising as an alternative to the traditional collagens with great potential of industrial application.

**Keywords:** Collagen; Fish; FTIR; SDS-PAGE; Pepsin; Properties.

## LISTA DE FIGURAS

### ARTIGO I

- Figura 1 – a) Espectro de FTIR b) Segunda derivada dos espectro dos colágenos dos resíduos do processamento de tilápia .....52
- Figura 2 – Eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) dos colágenos dos resíduos do processamento de tilápia extraídos com pepsina.....53

### ARTIGO II

- Figura 1 - Eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) dos colágenos dos resíduos do processamento colágeno extraído com pepsina.....85
- Figura 2 - Solubilidade relativa observada (%) do colágeno dos resíduos do processamento de tilápia extraído com pepsina em função do pH.....86

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Principais tipos de colágeno e distribuição tecidual .....	24
Quadro 1 – Estudos que mencionaram a extração de colágenos de pescados disponíveis na literatura.....	27

### ARTIGO I

Tabela 1 – Composição centesimal dos resíduos do processamento de tilápia .....	50
Tabela 2 – Composição centesimal dos resíduos do processamento de tilápia pré-tratados.....	50
Tabela 3 – Composição centesimal dos colágenos dos resíduos do processamento de tilápia (g/100g de amostra).....	51
Tabela 4 – Principais picos do espectro de infravermelho com transformada de Fourier do colágeno da pele da tilápia.....	51

### ARTIGO II

Tabela 1 – Composição centesimal para os resíduos do processamento de tilápia: carcaça, resíduo da carcaça e pele, com e sem branqueamento.....	81
Tabela 2 – Capacidade de formação de espuma (CFE) e estabilidade da espuma (EE) dos colágenos $C_{col}$ , $RC_{col}$ e $P_{col}$ , extraídos com pepsina na concentração de 0.25%.....	82
Tabela 3 – Índice de estabilidade da emulsão (ESI) para os colágenos dos resíduos do processamento de tilápia, extraídos com pepsina.....	83
Tabela 5 – Digestibilidade <i>in vitro</i> dos colágenos dos resíduos do processamento de tilápia, extraídos com pepsina. ....	83
Tabela 6 – Viscosidade dos colágenos obtidos para os resíduos do processamento de tilápia.....	84

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ANOVA	Análise de Variância Univariada
AOAC	Association of Official Analytical Chemists
BSE	Encefalopatia Espongiforme Bovina
C <sub>col</sub>	Colágeno da Carcaça da tilápia
CFE	Capacidade de Formação de Espuma
EAI	Índice de Atividade Emulsionante
EEs	Estabilidade da Espuma
ESI	Índice de Estabilidade da Emulsão
FAO	Organização das Nações Unidas para a Alimentação e a Agricultura
FTIR	Espectroscopia de Infravermelho de Transformada de Fourier
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Peróxido de Hidrogênio
P <sub>col</sub>	Colágeno da Pele de tilápia
pH	Potencial Hidrogeniônico
RC <sub>col</sub>	Colágeno do Resíduo de Carcaça de tilápia
SDS-PAGE	Eletroforese em Gel de Poliacrilamida

## SUMÁRIO

<b>LISTA DE FIGURAS.....</b>	<b>11</b>
<b>LISTA DE TABELAS.....</b>	<b>12</b>
<b>LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS .....</b>	<b>13</b>
<b>1 INTRODUÇÃO .....</b>	<b>14</b>
<b>2 OBJETIVOS .....</b>	<b>17</b>
2.1 OBJETIVO GERAL.....	17
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	17
<b>3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA .....</b>	<b>18</b>
3.1 PRODUÇÃO MUNDIAL DE PESCADO.....	18
3.2 PRODUÇÃO DE PESCADOS NO BRASIL.....	18
3.3 RESÍDUOS DO PROCESSAMENTO DE PESCADOS.....	19
3.4 TILÁPIA ( <i>Oreochromis niloticus</i> ) .....	20
3.5 COLÁGENO .....	21
3.6 OBTENÇÃO DO COLÁGENO .....	24
3.7 APLICAÇÃO DO COLÁGENO.....	28
3.8 PERÓXIDO DE HIDROGÊNIO.....	28
<b>4. DESENVOLVIMENTO.....</b>	<b>30</b>
4.1 ARTIGO I.....	30
4.2 ARTIGO II.....	54
<b>5 CONSIDERAÇÕES FINAIS.....</b>	<b>88</b>
<b>6 SUGESTÕES DE TRABALHOS FUTUROS.....</b>	<b>88</b>
<b>7 CONCLUSÃO.....</b>	<b>89</b>
<b>8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>90</b>

## 1 INTRODUÇÃO

O Brasil é o quarto maior produtor mundial de tilápia. Em 2017 foram produzidas 357,6 mil toneladas (IBGE, 2017). Segundo Kubitzka (2015), apesar de o Brasil ser um grande produtor de frango, bovinos e suínos, a aquicultura foi o setor de proteína animal que apresentou maior incremento percentual em produção entre 2004 e 2014, com crescimento anual médio de 8%, contra 5,1% para bovinos, 4,1% para o frango e 2,9% para suínos. Enquanto a produção de peixes cresceu em torno de 10%, no período de 2004 a 2014, a tilapicultura teve um crescimento da ordem de mais de 14% (Kubitzka, 2015).

O crescimento da produção e o interesse pela tilápia se deve primeiramente a grande aceitação do produto no mercado, quando os frigoríficos começaram a destinar ao mercado interno filés frescos de tilápia com padrão de exportação. Um dos fatores importantes é a oferta constante de produto de alta qualidade, que ajuda a conquistar a confiança dos consumidores em relação ao produto. No Brasil há um déficit na oferta de pescado, pois, o brasileiro possui a falta de hábito de consumir peixes, não por falta de hábito, mas sim por falta de produto de confiança e qualidade. A oferta de tilápias inteiras e filés de tilápia de alta qualidade e frescos foi um fator decisivo para o consumidor adquirir confiança nos produtos da tilapicultura (Matsuda, 2016).

Um dos maiores problemas na cadeia produtiva da pesca é a grande quantidade de resíduos gerados após a filetagem. No caso da tilápia, os resíduos chegam a 70% durante a produção de filé, sendo distribuídos em cabeça, carcaça, vísceras e pele, fazendo com que o interesse por soluções e aproveitamento destes resíduos seja cada vez maior (Bueno et al., 2011).

Segundo Gómez-Guillén et al. (2002) a extração de colágenos e seus derivados de pescados, é considerado a melhor forma de processar os resíduos da indústria de pescado, garantindo um maior aproveitamento e conseqüentemente maior lucro.

Os resíduos de pescados possuem pigmentos, que podem ocasionar problema na cor dos colágenos extraídos. O branqueamento é uma alternativa que pode ser realizado antes da extração. O peróxido de hidrogênio é um oxidante que é amplamente utilizado como agente de branqueamento no processamento de frutos do mar (Kolodziejska, Sikorski, & Niecikowska, 1999; Thanonkaew et al. 2008).

Kolodziejska et al. (1999) relataram que a imersão da pele de lula em peróxido de hidrogênio a 1% em NaOH 0,01 M por 48h melhorou a cor dos colágenos extraídos. A

decomposição de  $H_2O_2$  em solução aquosa ocorre por dissociação e homolítica clivagem das ligações O-H ou O-O, com a formação de produtos altamente reativos: o ânion hidroperoxil ( $HOO^-$ ) e o hidroperoxil ( $HOO$ ) e hidroxila ( $OH$ ) radicais, que podem reagir com muitas substâncias, incluindo cromatóforos (Perkins, 1996).

A utilização dos resíduos do processamento de pescados é ecologicamente recomendável em função do elevado teor de matéria orgânica depositada no meio ambiente, se os mesmos não forem reaproveitados. Uma das aplicações é a extração de colágeno a partir de escamas e peles para indústrias alimentícias e farmacêuticas (Vidotti & Gonçalves, 2006).

Há obtenção de colágenos e seus derivados dos resíduos dos processamentos, sugerem serem uma boa opção para reduzir os impactos ambientais causados pelos resíduos das indústrias de pescados tendo em vista o aproveitamento destes resíduos e o emprego dos colágenos e seus derivados na indústria alimentícia, farmacêutica e cosmética.

Na literatura existe poucos estudos disponíveis sobre a obtenção e caracterização de colágenos dos resíduos provenientes do processamento da tilápia. Os estudos encontrados foram direcionados à pele da tilápia. Neste contexto, este estudo teve por objetivo caracterização, obtenção e os efeitos no pré-tratamento com peróxido de hidrogênio no branqueamento de colágenos do resíduo do processamento de tilápia.

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 OBJETIVO GERAL

Extração e caracterização do colágeno a partir de diferentes resíduos do processamento de tilápia (*Oreochromis niloticus*) através de hidrólise química- enzimática.

### 2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Caracterizar os diferentes resíduos gerado no processamento de tilápia;
- Testar diferentes métodos e processos de extração de colágeno;
- Obter o colágeno por hidrólise enzimática;
- Diferenciar o colágeno com e sem branqueamento;
- Caracterizar os colágenos obtidos;
- Avaliar as propriedades dos colágenos.

### 3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Nesta revisão será apresentada a fundamentação teórica e a revisão bibliográfica sobre os resíduos do processamento da tilápia (*Oreochromis niloticus*); sobre a produção mundial de pescados; os métodos de extração; obtenção do colágeno utilizando pepsina e alguns estudos disponíveis na literatura sobre colágeno extraído de pescados.

#### 3.1 PRODUÇÃO MUNDIAL DE PESCADO

Segundo os levantamentos estatísticos da FAO a produção mundial de pescados para o ano de 2015 foi de aproximadamente 169,2 milhões de toneladas/ano para peixes, crustáceos, moluscos e outros animais aquáticos, o que representa um aumento de 2,73% em relação ao ano de 2014 que apresentou valores de 164,7 milhões de toneladas/ano (FAO, 2017).

A pesca contribuiu no ano 2015 com 92,6 milhões de toneladas/ano, o que representa 54,7% da produção total, apresentando um acréscimo de 1,5 milhões de toneladas/ano comparado aos valores do ano de 2014 que são 91,1 milhões de toneladas/ano, que representava cerca de 55,3% da produção total. O leve declínio cerca de 0,6% demonstrado nos valores mencionados acima sobre a contribuição da pesca extrativa para o montante representativo da produção mundial de pescado demonstra uma tendência que é significativa quando analisamos em comparativo (FAO, 2017). O setor de aquicultura é muito diverso e fragmentado em todo o mundo, variando de pequenos produtores a grandes empresas internacionais com faturamento anual superior a R\$ 1 bilhão. (BNDES, 2013).

A aquicultura contribuiu com aproximadamente 45,2% para produção mundial de pescado no ano de 2015 com 76,6 milhões de toneladas/ano, o que representa um aumento de 0,6% na contribuição da aquicultura para o montante da produção de pescado no mundo quando comparado aos valores estatísticos da FAO para o ano de 2014 que foi 73,6 milhões toneladas/ano, que correspondeu a 44,6% da produção total de pescado daquele ano. (FAO, 2016).

#### 3.2 PRODUÇÃO DE PESCADOS NO BRASIL

O Brasil é banhado por uma costa marítima de 8,5 mil quilômetros, possui 12% de toda a água doce do planeta, e ainda 8,2 bilhões de metros cúbicos de água distribuídos em rios,

lagos, açudes e represas. Com condições ambientais e climáticas favoráveis e tanta riqueza natural tem potencial para se tornar um dos maiores produtores de pescado no mundo (MPA, 2015). A piscicultura brasileira produziu 691.700 toneladas em 2017, e possui um crescimento anual de 8% (PEIXE BR, 2017).

A Tilápia é a mais importante espécie de peixes cultivados do Brasil. Segundo levantamento da Associação Brasileira da Piscicultura (PEIXE BR) a espécie representa 51,7% da piscicultura nacional, com 357.639 toneladas em 2017. A segunda posição não é de uma espécie em si, mas de uma categoria de peixes: os nativos, que representam 43,7% da produção brasileira: 302.235 toneladas (PEIXE BR, 2018).

Os números da Tilápia no país comprovam sua viabilidade em termos produtivos e como negócio, já que a espécie está presente nos maiores e mais recentes empreendimentos, principalmente nas regiões Sul e Sudeste (PEIXE BR, 2018)

### 3.3 RESÍDUOS DO PROCESSAMENTO DE PESCADOS

O crescimento populacional e o aumento no consumo de produtos industrializados vêm contribuindo para agravar o problema do gerenciamento dos resíduos industriais, causados principalmente, pela maior oferta de produtos que passaram por algum beneficiamento. O grande volume de resíduos gerados pelas indústrias, oriundos das mais diversas cadeias produtivas, cujos descartes indevidos geram grandes impactos negativos ao meio ambiente, como é o caso dos resíduos provenientes da indústria pesqueira (Oliveira et al., 2013).

Os resíduos do processamento de pescados são destinados principalmente à alimentação animal, mas também podem ser reaproveitados para a produção de fertilizantes ou produtos químicos (Cavalcante Júnior et al., 2005; Lee, 1963; Seibel & Soares, 2003). Os resíduos possuem um alto valor nutricional, ricos em proteínas e em ácidos graxos ( $\omega$ -3) o que incentiva o desenvolvimento de produtos para a alimentação humana ou para a indústria farmacêutica. O uso de tecnologias com esta finalidade aumenta a capacidade da indústria da pesca a não só à demanda por produtos diferenciados, mas também à busca por alimentos saudáveis e com alto valor nutritivo, suprimindo as necessidades nutricionais, em especial de proteínas animais, dos setores mais carentes da população, por um preço acessível (Jorge, 1997; Miranda et al., 2003).

O baixo custo da matéria-prima e a elevada qualidade nutricional, tornam os resíduos oriundos da indústria de processamento de pescado extremamente atrativos, quando foco é utiliza-los para produção de subprodutos agregando valor, diminuindo assim o impacto

ambiental e aumentando a rentabilidade da indústria. Estudos recentes identificaram a predisposição dos resíduos do processamento do pescado para a produção de coprodutos tais como a farinha de peixe (Aguiar & Goulart, 2014).

Os resíduos do processamento de pescados constituem em uma rica fonte de micronutrientes, minerais, ácidos graxos essenciais e proteínas. A proteína de peixes, crustáceos e moluscos (excluídas plantas aquáticas e mamíferos marinhos) representa cerca de 20% das fontes alimentares de proteína animal consumidas no mundo (FAO, 2007). As proteínas musculares do peixe possuem elevado valor biológico, com uma composição balanceada em aminoácidos, particularmente aqueles limitantes em proteínas de origem vegetal, como a metionina e a cisteína (Neves et al., 2004).

### 3.4 TILÁPIA (*Oreochromis niloticus*)

O Brasil é o quarto maior produtor mundial de tilápia. Em 2017 foram cultivadas 357,6 mil toneladas, obteve um desempenho 16% maior que em 2016 (IBGE, 2017). Segundo Kubitza (2015), apesar de o Brasil ser um grande produtor de frango, bovinos e suínos, a aquicultura foi o setor de carnes que apresentou maior incremento percentual em produção entre 2004 e 2014, com crescimento anual médio de 8%, contra 5,1% para bovinos, 4,1% para o frango e 2,9% para suínos. Destacando a indústria de produção de tilápia no Brasil que vem crescendo nos últimos anos.

Mais de 50% dos resíduos do processamento de pescados produzidos é apresentado no final da linha de produção na forma de resíduo, sendo que cerca de 30 milhões de toneladas não tem quaisquer aplicações, pois, não possuem aproveitamento por conta de limitações mercadológicas e tecnológicas (Dragnes et al., 2009; Martins, 2011). No Brasil o pescado de água doce de maior interesse industrial e comercial é a tilápia, sendo processada para obtenção de filés frescos ou congelados, onde o seu rendimento médio é de aproximadamente 30% e os outros 70% são resíduos que incluem cabeça, carcaça, vísceras, pele e escamas (Aguiar et al., 2014).

Estudos vêm abordando sobre a obtenção de 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 muitos estudos disponíveis sobre o colágeno de resíduo do processamento da tilápia.

Segundo a agroindústria parceira deste projeto, Cooperativa Agroindustrial Consolata (Copacol), o volume de resíduo do processamento de tilápia é grande e atualmente a empresa destina este resíduo para fabricação de ração com um baixo valor.

O resíduo do processamento da tilápia contém alto teor de proteínas, o que o torna uma alternativa promissora para obtenção de colágeno, permitindo a agregar valor a este resíduo, visto que colágenos e hidrolisados possuem elevado valor comercial.

### 3.5 COLÁGENO

O colágeno é um produto de alto valor comercial e tem sido fonte de estudos para uso industrial devido à sua abundância no tecido animal (bovinos, suínos, caprinos, ovinos, peixes, anfíbios, entre outros) (Fauzi et al. 2016; Masilamani et al. 2016; Krishnamoorthi et al. 2017). Dentre os vários subprodutos utilizados para obtenção de colágeno destacam-se os peixes, especialmente devido a sua disponibilidade, ausência de risco de transmissão de doenças, barreiras religiosas, alto rendimento no processo de extração e ausência de toxicidade (Senaratne et al. 2006; Krishnamoorthi et al. 2017).

O termo colágeno deriva das palavras gregas *Kolla* (cola) e *Genno* (produção) (Olivo et al, 2001). O colágeno é uma das principais proteínas estrutural do reino animal, constitui cerca de 30% de toda a matéria-prima orgânica do corpo dos animais e 60% das proteínas totais do corpo (Ockerman et. al, 1994). O termo “colágeno” é atualmente utilizado para denominar uma família de pelo menos 27 isoformas de proteínas encontradas em tecidos conjuntivos ao longo do corpo, como nos ossos, tendões, cartilagem, veias, pele, dentes e músculos (Damodaran et. al, 2010; Deman et. al, 1999).

Existem diferentes tipos de colágenos nos vertebrados, em geral possuem 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, GlyX-Y, sendo frequentemente X a Pro e Y a Hyp (Nelson & Cox, 2005).

O colágeno Tipo I é o mais abundante e pode ser encontrados na pele, tendões, ligamentos e ossos. O colágeno Tipo I é uma proteína macromolecular constituída de três cadeias polipeptídicas (duas  $\alpha_1$  e uma  $\alpha_2$ ) que estão sob a forma helicoidal em sua porção central e nas extremidades amínica e carboxílica permanecem na forma globular (Torley et al. 2000).

O colágeno do Tipo II ocorre praticamente exclusivamente em tecido de cartilagem e acredita-se que a subunidade  $\alpha_1(\text{II})$  seja semelhante à  $\alpha_1(\text{I})$ . 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).

O colágeno é um importante biomaterial, que possui muitas aplicações nos campos biomédicos, farmacêuticos e alimentícios, isso devido à sua fraca antigenicidade, biodegradabilidade, biocompatibilidade e bioatividade. Há um grande interesse e estudo na utilização do colágeno, na regeneração de tecidos (pele, substitutos de ossos, implantes, tendões artificiais, vasos sanguíneos, implantes de córnea e regeneração de cartilagem), no encapsulamento de fármacos, formulação de cosméticos, e mais recentemente, na formação de filmes e revestimentos para alimentos e hidrogel para sistemas de liberação controlada de compostos químicos importantes (Kozłowska et al., 2015; Veeruraj et al., 2015; Boccafoschi et al., 2005).

Na Tabela 1 podemos observar os tipos e a distribuição tecidual do colágeno no organismo de mamíferos. Até o presente momento, foram identificados 29 tipos genéticos distintos de colágeno, muitos dos quais com características únicas e alguns com características inter-relacionadas; contudo, todos sendo formados por subunidades polipeptídicas designadas de cadeias (Chung et al. 2010; Zeugolis et al. 2011; Fauzi 2016). Nove deles são frequentemente disponíveis, incluindo os colágenos dos Tipos I, II, III, IV, V, VII, IX, XI e XII (Fauzi, 2016) e podem ser divididos em tipos fibrilares e colágenos não fibrilares. Os tipos fibrilares I, II e III formam fibrilas de colágeno típicas com uma periodicidade axial de 67nm e são os colágenos mais abundantes (An et al. 2016).

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

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

**Fonte:** Adaptado de Gelse (2003).

Os colágenos Tipos I, II, III, V, X, XXIV e XXVII alinham-se em grandes fibrilas extracelulares e são designados como colágenos formadores de fibrilas ou colágenos fibrilares (Zeugolis & Raghunath 2011). Tipo IV é organizado em um entrelaçamento dentro das membranas basais, enquanto o Tipo VI forma microfibrilas distintas e o Tipo VII forma fibrilas de ancoragem (Olsen, 1995; Teruel, 1997; Uitto et al. 2008; Chung & Uitto, 2010).

Os colágenos associados às fibrilas são estruturas curtas que ligam as fibrilas de colágeno umas às outras e os outros componentes da matriz extracelular, pertencendo a este grupo os colágenos dos Tipos IX, XII, XIV, XIX, XX e XXI (Olsen, 1995; Teruel, 1997; Uitto, Chu 2008; Chung & Uitto, 2010). O colágeno do Tipo XXVIII já foi expresso no fígado, timo, músculo, intestino e pele de espécies de peixes (Gebauer, Kobbe, Paulsson & Wagener, 2015). Uma baixa abundância de colágenos dos Tipos V e XI, mas eles são encontrados associados com os Tipos I e II, no osso e na cartilagem, bem como em outros tecidos, com importante participação na função de resistência à tensão (Daboor et al. 2010; Junqueira & Carneiro 2011).

### 3.6 OBTENÇÃO DO COLÁGENO

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, 8 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 das impurezas e das proteínas não colagenosas. Há vários estudos de diferentes métodos de extração de colágeno. Os métodos de extração comumente empregados baseiam-se na solubilidade do colágeno em soluções salina neutra, ácidas e ácidas adicionadas de enzimas. 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 (Wang et al., 2014; Li et al., 2013, Nagai et al., 2014).

Wang et al. (2014) isolaram e caracterizaram colágeno da pele de peixe Amur sturgeon (*Acipenser schrenckii*) e realizaram a 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.

Dentre as várias espécies utilizadas para a obtenção de colágeno, os peixes merecem atenção especialmente devido a sua grande disponibilidade, ausência de riscos de transmissão de doenças, de barreiras religiosas, alto rendimento no processo de extração e ausência de toxicidade (Senaratine et al., 2006). Segundo Song et al. (2006) relatam que inúmeros tecidos como pele, ossos, nadadeiras e escamas que constituem o peixe, podem ser utilizados para extração de colágeno e que apesar de apresentar propriedades físico-químicas diferentes do colágeno originário de tecidos de mamíferos, vem sendo utilizado em substituição ao mesmo.

Kittiphattanabown et al. (2010) extraíram colágeno de cartilagens de tubarão (*Chiloscyllium punctatum e Carcharhinus limbatus*), a extração foi realizada 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, pode-se observar alguns estudos que avaliaram a obtenção do colágeno partir de diferentes matérias-primas, pré-tratamentos, procedimentos de extração e diferentes tipos de caracterizações.

**Quadro 1** – Estudos que mencionaram a extração de colágenos de pescados disponíveis na literatura.

<b>Matéria-Prima</b>	<b>Pré-tratamento</b>	<b>Procedimento de extração</b>	<b>Caracterização</b>	<b>Referência</b>
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)
Cartilagens de tubarão ( <i>Chiloscyllium punctatum</i> e <i>Carcharhinus limbatus</i> )	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.	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.	SDS-PAGE Fracionamento em coluna cromatográfica. Mapeamento de peptídeos. DSC Potencial Zeta. FTIR	Kittiphattanabawon <i>et al.</i> (2010)
Pele de Amur esturjão ( <i>Acipenser schrenckii</i> )	Homogeneização com NaCl 20%, por 3 vezes a 4 °C.	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.	Microscopia eletrônica de varredura. DSC Dicroísmo circular (CD). Perfil de aminoácidos. SDS-PAGE FTIR	Wang <i>et al.</i> (2014)

<p>Pele e ossos de cavala (<i>Scomberomorous niphonius</i>)</p>	<p>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.</p> <p>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.</p>	<p>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.</p> <p>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.</p>	<p>Teor de hidroxiprolina. Perfil de aminoácidos. SDS-PAGE FTIR Viscosidade da solução de colágeno. Solubilidade. Mapeamento de peptídeos. Ultraestrutura do colágeno.</p>	<p>Li <i>et al.</i> (2013)</p>
---	--	---	--	--------------------------------

### 3.7 APLICAÇÃO DO 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).

O grande interesse das propriedades funcionais do colágeno não se resume apenas ao envelhecimento, mas sim, nos numerosos e recentes estudos que abrangem todas as áreas do conhecimento, onde a análise destas moléculas permite maior compreensão da origem de várias doenças decorrentes da síntese defeituosa, excesso ou insuficiência da produção destas proteínas, associando-as a síndromes raras, má formações e fraturas ósseas, problemas de locomoção e de pele, escleroses múltiplas e até óbitos relacionados à ruptura de artérias e intestino (Duarte, 2011).

Na medicina e na área odontológica os biomateriais criados a partir do colágeno representam uma alternativa terapêutica com aplicação variada já que apresentam grande biocompatibilidade e capacidade de promover a cura de feridas. Na área biomédica, tem sido utilizado para a reparação da parede abdominal, tendão, ligamento, reparação de feridas, entre outros (Oliveira et al., 2010).

O colágeno vem sendo utilizado 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).

### 3.8 PERÓXIDO DE HIDROGÊNIO

Poucos estudos utilizando o peróxido de hidrogênio no branqueamento de colágenos. No entanto, os pigmentos dos resíduos de pescados podem ocasionar problema na cor dos colágenos, o branqueamento é uma alternativa que pode ser realizado antes extração dos colágenos. O peróxido de hidrogênio um oxidante que é amplamente utilizado como agente de branqueamento no processamento de frutos do mar (Kolodziejska, Sikorski, & Niecikowska, 1999; Thanonkaew et al. 2008).

Kolodziejska et al. (1999) relataram que a imersão da pele de lula  $H_2O_2$  a 1% em NaOH 0,01 M por 48 h melhora a cor dos colágenos extraídos. A decomposição de  $H_2O_2$  em solução aquosa ocorre por dissociação e homolítica clivagem das ligações O-H ou O-O, com a formação de produtos altamente reativos: o ânion hidroperoxil ( $HOO^-$ ) e o hidroperoxil ( $HOO$ ) e hidroxila ( $OH$ ) radicais, que podem reagir com muitas substâncias, incluindo cromatóforos (Perkins, 1996). Lavar com água contendo  $H_2O_2$  também mostrou um efeito de melhoramento na cor da gelatina do surimi (Phatcharat, Benjakul, & Visessanguan, 2006).

O peróxido de hidrogênio é amplamente utilizado na indústria de cefalópodes (moluscos) como um agente de branqueamento. O cefalópode precisa passar pelo branqueamento, pois a carne e as vísceras possuem pigmentos escuros, que são indesejáveis para os consumidores (Thanonkaew et al., 2008).

De acordo com Lynch et al. (1995) os agentes clareadores, à base de peróxido, podem produzir radicais livres e altamente reativos. Esses radicais livres, derivados do oxigênio, degradam a molécula cromatogênica orgânica em moléculas menores, e menos pigmentadas, via processo oxidativo ou, ocasionalmente, por redução.

## **4. DESENVOLVIMENTO**

### 4.1 Artigo I

#### **COLÁGENO DE TILÁPIA (*OREOCHROMIS NILOTICUS*): UMA ALTERNATIVA PARA AGREGAR VALOR AOS SUBPRODUTOS DA INDÚSTRIA DE PESCADO**

**Artigo em fase final para ser submetido à Revista Food Chemistry**  
(Formatado conforme as normas da revista)

## COLÁGENO DE PEIXE

### **Colágeno de tilápia (*Oreochromis niloticus*): uma alternativa para agregar valor aos subprodutos da indústria de pescado**

Fontoura A. M. <sup>a\*</sup>, Thiel S. R. <sup>a</sup>, Sehen L. R. <sup>a</sup>, Kubota E. H. <sup>a</sup>, Demiate I. M. <sup>b</sup>,  
Dornelles R. C. P. <sup>a</sup>

Scientific section: Processing and products

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

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

\*Corresponding author: Andrine Menna da Fontoura. Address: Rua Riachuelo, nº 60,  
apto 304, 97050-010, Centro, Santa Maria, Rio Grande do Sul, Brazil, Tel: +55 55  
999095260. E-mail: andrine.fontoura@gmail.com

## RESUMO

Os resíduos do processamento da tilápia chegam a 70%. O Brasil se destaca na produção de tilápia, ocupando a quarta posição no canário mundial, assim a obtenção do colágeno a partir dos resíduos do processamento da tilápia podem ser uma alternativa para agregar valor a este resíduo. O objetivo deste estudo foi a obtenção e caracterização de três resíduos do processamento de tilápia (*Oreochromis niloticus*): carcaça (C), resíduo da carcaça (RC) e pele (P). Os resíduos do processamento da tilápia apresentaram diferenças significativas ( $p > 0,05$ ) em seu teor de proteínas (C=13,13%; RC=15,36% e P=28,21%). Os colágenos obtidos da carcaça, resíduo da carcaça e pele apresentaram rendimentos de 8,75, 16,93 e 27,5%, respectivamente. As análises de SDS-PAGE e FTIR demonstraram que os colágenos obtidos são constituídos principalmente do colágeno tipo I. Diante deste estudo a obtenção de colágeno a partir dos subprodutos mostrou-se ser uma alternativa aos colágenos de mamíferos e com grande potencial e aplicação industrial, agregando valor aos resíduos do processamento de pescados. O melhor resíduo do processamento de tilápia foi a pele, pois, obteve um elevado rendimento.

**Palavras-chave:** Tilápia; Pepsina; FTIR; Eletroforese.

## 1 INTRODUÇÃO

A tilápia (*Oreochromis niloticus*) é um dos peixes mais importantes cultivados no Brasil, segundo levantamento da Associação Brasileira da Psicultura (PEIXE BR), a espécie representa 51,7% do mercado, em 2017 a produção no Brasil foi de 357.639 toneladas.

De acordo com Cho et al. (2014) a aquicultura brasileira passou por importantes transformações, o pescado é considerado um produto de grande interesse por conter elevado teor de proteína bruta. Com o aumento do consumo de pescado se tem uma variedade de resíduos do processamento gerados pela indústria, tais como cabeça, cauda, escamas, barbatanas, bexiga natatória, cartilagens, vísceras e pele (Oliveira et al., 2017a; 2017b), os resíduos representam mais de 50% do peso do pescado se tornando um prejuízo ambiental e econômico quando descartado inadequadamente (Ferraro, Anton & Santé-Lhoutellier, 2016).

A partir dos resíduos descartados surge a alternativa do reaproveitamento para extração de biomoléculas, como colágeno, colagenases, pepsina, tripsina, quimotripsina (Masilamani et al, 2016; Oliveira *et al.*, 2017a; 2017b).

Alguns estudos vêm abordando 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 muitos estudos disponíveis sobre colágeno extraído resíduos do processamento de pescados (Gómez-Guillén et al., 2009; Gómez-Guillén et al., 2011; Kaewdang et al., 2014; Kittiphattanabawon et al., 2005a; Kittiphattanabawon et al., 2010b).

O colágeno representa cerca de 30% da proteína animal total, sendo o principal constituinte da pele, tendões, cartilagens, ossos e dos tecidos em geral, (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).

O processo de filetagem da tilápia, gera um resíduo constituído da carcaça, pele, escamas e vísceras. Com isso temos que de 50 % a 70 % da matéria-prima do pescado é considerada resíduo de processamento (Sucasas, 2011), este não possui valor comercial, tornando-se assim, um problema ambiental quando não descartado da maneira correta (Silva, 2010).

A quantidade de resíduos sólidos gerados na indústria de pescado, torna-se relevante o reaproveitamento dos resíduos do processamento como subprodutos com valor comercial,

visando a diminuição do impacto ambiental e também o aumento do rendimento produtivo (Sucasas, 2011). Uma alternativa é a utilização de processos biotecnológicos para a transformação deste em produtos rentáveis, a realização da obtenção de colágenos e seus derivados. Consiste na utilização de enzimas visando a quebra das proteínas de cadeias longas em cadeias menores que possam ser recuperadas e utilizadas em produtos nas indústrias alimentícias e farmacêuticas (Santos, 2011; Lunelli, 2015). O presente estudo teve como objetivo a caracterização e obtenção de colágenos dos resíduos do processamento de tilápia.

## 2 MATERIAL E MÉTODOS

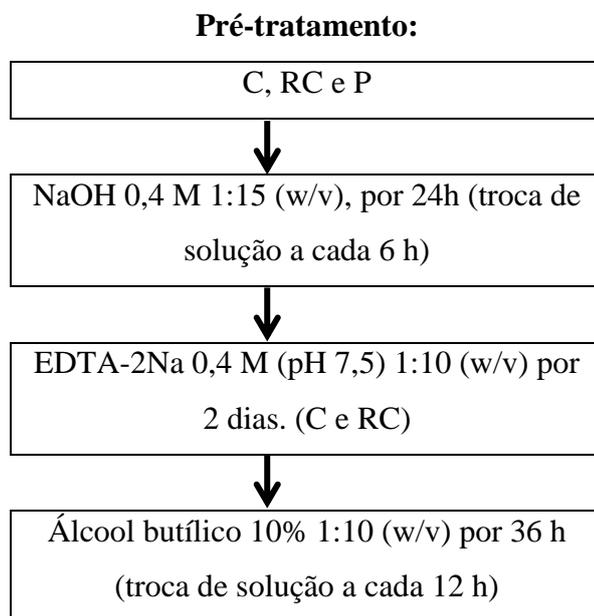
Os resíduos do processamento da tilápia (*Oreochromis niloticus*) foram doados pela Cooperativa Agroindustrial Consolata (Copacol) unidade de Cafelândia (PR). Os resíduos foram congelados e mantidos em freezer (Metalfrio, VF50F) a -22°C até a utilização.

Os resíduos utilizados para obtenção e caracterização de colágeno foram: carcaça (C), resíduo de carcaça (RC) e a pele (P).

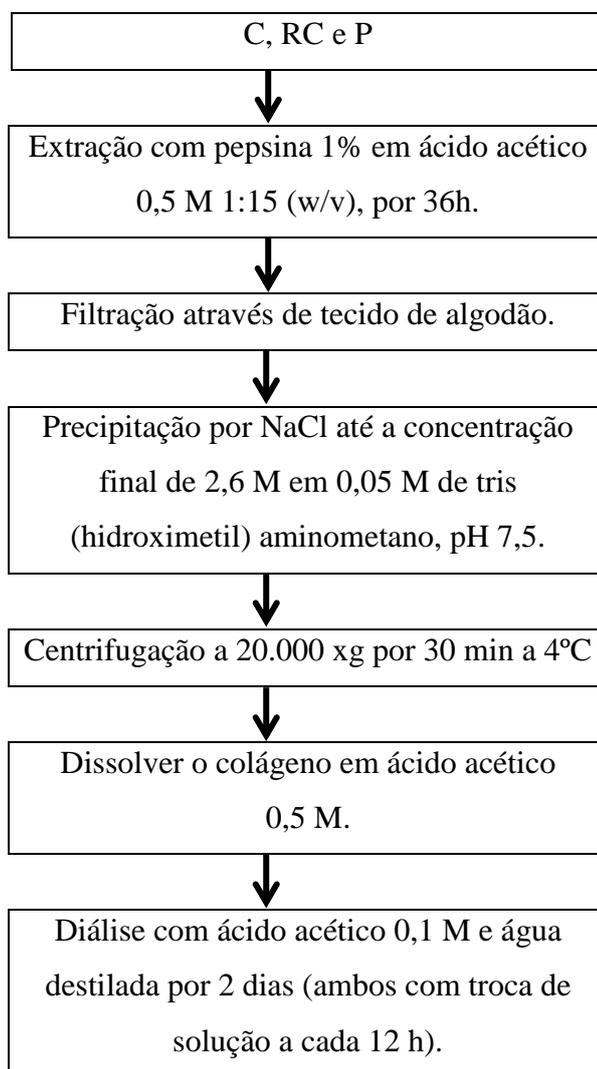
### 2.1 Caracterização da matéria-prima

Para a composição centesimal dos resíduos do processamento da tilápia (carcaça, resíduo de carcaça e pele), foram realizadas as seguintes determinações: pH (determinação eletrométrica), protídeos (método Kjeldahl modificado), umidade (105°C) e cinzas (incineração 550°C) seguindo a metodologia descrita pela AOAC (1996). A determinação de lipídios foi seguindo a metodologia Bligh & Dyer (1959), extração com solvente à frio.

### 2.2 Obtenção dos colágenos



### Extração do colágeno:



### 2.3 Pré-tratamento

Para a remoção das impurezas foi realizado um pré-tratamento nos resíduos do processamento da tilápia seguindo metodologia de Singh et al. (2011) com adaptações. Para retirar as proteínas não colagenosas utilizou-se uma solução de hidróxido de sódio (NaOH) 0,4 M por 24 horas com trocas a cada 6 horas da solução, com razão amostra/solução alcalina 1:15 (p/v), para descalcificação da carcaça e do resíduo de carcaça, utilizou-se uma solução de EDTA (Ácido Etilenodiaminatetracético Dissódico) 0,5 M (pH 7,5) por 2 dias. A gordura foi removida utilizando uma solução de álcool butílico 10% por 36 horas, com razão sólido/solvente de 1:10 (p/v), com troca do solvente a cada 12 horas.

## 2.4 Extração enzimática

Após o pré-tratamento dos resíduos do processamento da tilápia, o colágeno foi extraído com a enzima pepsina seguindo a metodologia proposta por Kittiphattanabawon et al. (2010) com modificações. Foi adicionado ácido acético 0,5 M, contendo a enzima pepsina (extraída da mucosa gástrica porcina, em pó,  $\geq 400$  unidades/mg de proteína, Alphatec), na proporção 1:7 enzimas/proteínas, com razão sólido/solvente de 1:15 (p/v) em Erlenmeyer. A solução contendo pepsina e ácido acético ficou sobre agitação contínua por 36h, seguido de filtração através de tecido de algodão. Todos os procedimentos do pré-tratamento e extração foram realizados sob agitação em Incubadora Shaker (Solab SL-223, Piracicaba, Brasil) a 160 rpm a uma temperatura de 4 °C.

Após o pré-tratamento e filtração, 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. O colágeno precipitado foi centrifugado a 10.000 rpm por 30 minutos, em centrifuga refrigerada (Centrifuga Eppendorf 5804/5804 R) a 4 °C, posteriormente foi realizada a diálise em membrana de celulose (Typical molecular weight cut-off 14.000 KDa, Sigma, St. Louis, USA), com ácido acético 0,1 M e água destilada por dois dias, ambos a 4 °C sob agitação, com troca da solução a cada 12 horas. Após todo o processo de extração do colágeno, foi congelado em freezer (Metalfrio, VF50F) a -22 °C e liofilizado em liofilizador (Terroni, LS 3000, São Carlos, Brasil).

## 2.5 Rendimento

Os rendimentos dos colágenos foram calculados em base do peso da amostra do pré-tratamento (amostra úmida) em relação ao peso da amostra liofilizada (amostra seca), de acordo com equação:

$$\text{Rendimento}(\%) = \frac{\text{peso do colágeno liofilizado (g)}}{\text{peso inicial (úmido) da pele (g)}} \times 100$$

## 2.6 Caracterização dos colágenos

### 2.6.1 Composição centesimal

Para a composição centesimal dos colágenos, foram determinados: protídeos, umidade, cinzas e pH seguindo a metodologia descrita pela AOAC (1996). E para lipídeos seguiu a metodologia de extração a frio, descrita por Bligh & Dyer (1959).

### 2.6.2 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 transmitância em pastilhas de KBr, no intervalo de 400 a 4.000  $\text{cm}^{-1}$ . Foram realizadas 16 varreduras por espectro e 2  $\text{cm}^{-1}$  de resolução.

### 2.6.3 Análise de eletroforese em gel de poli(acrilamida) (SDS-PAGE)

Para as análises de eletroforese em gel seguiu a metodologia proposta por Laemmli (1970) com modificações. As amostras foram diluídas em água milliq 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, as amostras com a solução ficaram em *overnight* por 12 horas em freezer. Posteriormente as amostras foram centrifugadas a 10.000  $\times g$ , 4  $^{\circ}\text{C}$  por 30 minutos, o sobrenadante foi retirado, tomando cuidado para que o *pellet* não fosse desfeito. Foi adicionado 100  $\mu\text{L}$  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  $\mu\text{L}$  de acetona 90% gelada e centrifugado nas mesmas condições, removendo novamente o sobrenadante. O precipitado foi ressuscitado com 50  $\mu\text{L}$  do tampão da amostra com 5% de  $\beta$ -mercaptoetanol, após as amostras foram desnaturadas em banho-maria a 100  $^{\circ}\text{C}$  por 10 minutos.

Utilizou-se gel de resolução 7,5% e gel de empilhamento 2,5%, onde foram adicionados 20  $\mu\text{L}$  das amostras a serem analisadas e 15  $\mu\text{L}$  do padrão de massa molar e submeteu-se a eletroforese a 150V e 30 mA, por aproximadamente 3 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.

## 2.7 Análise Estatística

Para a caracterização das matérias-primas e dos colágenos todas as análises centesimais foram realizadas em triplicatas. Os resultados foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e Teste de Tukey com nível de significância de 95% ( $p < 0,05$ ), utilizando Statistica® 9.0 (STATSOFT Inc., Tulsa, OK, EUA).

Para 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).

## 3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 3.1 Caracterização da matéria-prima

Os resultados da composição centesimal dos resíduos do processamento (carcaça, resíduo da carcaça e pele) da tilápia (*Oreochromis niloticus*) estão apresentados na Tabela 1. Pode-se observar que a pele da tilápia possui um elevado teor proteínico em base úmida (28,21%) quando comparada com a C e RC (13,13 e 15,36%), sendo semelhante aos valores descritos por Muyonga et al. (2004).

Os resíduos do processamento da tilápia apresentaram um teor de umidade para C (71,17%), RC (55,38%) e P (69,14%), estando próximo ao teor encontrado por Hoinacki (1989), que variaram entre 60 e 70 %. Os teores de cinzas encontrados mostraram diferença significativas entre si ( $p < 0,05$ ) a P (0,17%) ficou abaixo dos valores encontrados por Franco et al. (2013) e Muyonga et al. (2004), que encontraram respectivamente 1,82%, 3,7% em espécies jovens e 6% em adultos de cinzas na pele da tilápia, essa diferença deve-se a maior calcificação

das escamas em função da idade do pescado, os valores encontrados de cinzas para C e RC (7,63 e 10,57%) foram respectivamente elevados, isso devido ao alto teor de matéria mineral.

Na Tabela 2 observase que os pré-tratamentos para C, RC e P, foram eficiente uma vez que se conseguiu diminuir os níveis de cinzas e lipídeos, tornando a proteína o principal constituinte do resíduo pré-tratado,

### 3.2 *Rendimento*

Os rendimentos encontrados para os colágenos dos resíduos do processamento de tilápia foram de C (8,75%), RC (16,93%) e P (27,5%). O rendimento obtido da pele de tilápia foi superior ao encontrado por Zhang et al. (2016) que obtiveram um rendimento em pepsina solúvel de 21,8% para a pele de tilápia (*Oreochromis niloticus*), mas muito parecido com ao encontrado na pele de bagre-americano (*Ictalurus punctatus*) de 28,8% (Zhang et al. 2016). Entretanto o rendimento foi bem inferior ao encontrado Wang et al. (2007) na pele do cantarilho do Atlântico (*Sebastes mentella*) (92,2% em peso úmido). O rendimento da C foi próximo ao encontrado por Kittiphattanabawon et al. (2010a) na pele do tubarão-bambu (*Chiloscyllium punctatum*) 8,36% em peso úmido. Bhagwat & Dandge (2016) encontraram nas escamas de carpa (*Cyprinus carpio*) 9,79% semelhante ao encontrado no RC.

O rendimento da extração dos colágenos pode variar de acordo com a fonte enzimática e o tipo de extração. Jamilah et al. (2013) relataram combinações entre métodos para o isolamento de colágeno na pele de barramundi (*Lates Calcarifer*), e obtiveram rendimentos de 8,1, 43,6 e 44,0% para extrações utilizando ácido, pepsina e papaína, respectivamente.

### 3.3 *Caracterização do colágeno*

#### 3.3.1 *Composição centesimal*

A Tabela 3 apresenta a composição centesimal dos colágenos dos resíduos do processamento da tilápia (C, RC e P). Pode-se observar que a proteína foi o principal constituinte da C<sub>col</sub>, RC<sub>col</sub> e P<sub>col</sub> (87,75, 85,74 e 90,20%, respectivamente), sendo semelhantes aos valores encontrados no colágeno na pele da tilápia por Basso et al. (2013) e Muyonga et. al (2004) 91,24 e 92,8% de proteína, respectivamente.

Os teores da  $RC_{col}$  e  $P_{col}$  encontrado para umidade foram próximos aos encontrado na gelatina da pele de tilápia (*Oreochromis niloticus*) 9,3% (Bueno et al. 2011). Trindade (2010) encontrou valor semelhante (12%) no teor de umidade, próximo ao encontrado no  $C_{col}$  de 10,29%

Os teores de cinzas encontrados no  $C_{col}$  e  $RC_{col}$  (3,74 e 2,90%) foram superiores aos valores encontrados por Haug et al. 2004) (0,82%), mas bem próximo do valor encontrado na  $P_{col}$  (0,87%). O teor de lipídeos encontrado foi superior ao obtido por Alfaro (2008) obteve teor de 0,25% de lipídeos em gelatina a partir da pele de tilápia.

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

Os espectros de FTIR dos resíduos dos colágenos de tilápia exibiram picos característicos de Amida A e B, bem como Amida I, II, III, como podemos observar na Figura 1 e a descrição correspondente dos picos na Tabela 4. Os principais picos dos espectros de colágeno da pele da tilápia foram semelhantes aos do colágeno purificado de outras espécies de peixes (Kaewdang et al. 2014; Singh et al., 2011; Zhang et al. 2014).

A banda da amida A foi encontrada no 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  $CH_2$  (Abe and Krimm, 1972).

Sabe-se que as bandas amida I, II e III são responsáveis pelo grau de ordem molecular encontrado no colágeno e envolvidos na formação de sua estrutura helicoidal tripla, que resulta do alongamento de C-O e da flexão de NH e alongamento de C-H, respectivamente (Muyonga, Cole & Duodu, 2004).

Payne e Veis (1988), encontrou a banda de amida I ( $1658\text{ cm}^{-1}$ ), com frequências características na gama entre  $1600\text{ a }1700\text{ cm}^{-1}$ , associou principalmente às vibrações de estiramento dos grupos carbonila ao longo do esqueleto polipeptídico.

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 ligados 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 da pele de tilápia foi de 0,93, 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 tripla helicoidal foi mantida e não foi afetada pela pepsina durante o processo de extração do colágeno.

O método matemático descrito por Forato et al. (1998) foi aplicado ao espectro de FTIR do colágeno da pele de tilápia para aumentar sua resolução, através do uso da derivação, como mostra na 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.

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

Na Figura 2 estão apresentados o SDS-PAGE  $C_{col}$ ,  $RC_{col}$  e  $P_{col}$  dos resíduos do processamento da tilápia, utilizando gel a 15%. Observa-se duas bandas distintas, próximo a 125 kDa, correspondentes à duas cadeias  $\alpha$  ( $\alpha_1$  e  $\alpha_2$ ). Matmaroh et al. (2011) relataram que o colágeno tipo I contém 2 cadeias de  $\alpha_1$  e uma de  $\alpha_2$ . O colágeno tipo I foi o principal colágeno encontrado na pele e escamas dos peixes (Tamilmozhi et al., 2013). Thuy et al. (2014), extraiu colágeno de escamas de peixe e encontrou o colágeno tipo I, podemos observar que o colágeno tipo I da pele da tilápia está de acordo com estudos encontrados anteriormente.

Os valores encontrados na SDS-PAGE foram semelhantes à massa molecular do colágeno da pele de carpa e da pele de carneiro (Ogawa et al., 2003), colágeno da pele de carpa (Duan et al., 2009) e colágeno da pele de tilápia (Chen, Li et al., 2016).

## 4 CONCLUSÃO

Os colágenos extraídos da carcaça, resíduo da carcaça e da pele de tilápia (*Oreochromis niloticus*), exibiram um rendimento de 8,75, 16,93 e 27,5%, respectivamente, quando comparados com estudos anteriores. Os pré-tratamentos foram eficientes no isolamento da proteína, retirando todas as impurezas.

Os colágenos mostraram picos no espectro FTIR, com banda das amidas A e B e I, II e III. A partir de SDS-PAGE foi determinado que o colágeno é constituído principalmente por colágeno do tipo I.

A obtenção de colágenos dos resíduos dos processamentos, indicam serem uma alternativa para reduzir os impactos ambientais causados pelos resíduos das indústrias de pescados tendo em vista o reaproveitamento destes resíduos. Os resíduos dos processamentos de tilápia comprovaram serem uma fonte tecnologicamente viável para extração de colágeno, mostrando-se como alternativa aos colágenos de mamíferos e com potencial de aplicação industrial, tornando possível a agregação de valor.

Podemos assim concluir que os resíduos gerados pela indústria da pescados, mostraram uma alternativa para reduzir os impactos ambientais causados pela indústria de pescados.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Alfaro, A. T. 2008. Otimização das condições de extração e caracterização da gelatina de pele de tilápia (*Oreochromis urolepis hornorum*). Tese de Doutorado (Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia Agroindustrial). Universidade Federal de Pelotas.

AOAC - Association of Official Analytical Chemists. 1996. Official methods of analysis of the Association Analytical Chemists. 16<sup>th</sup> ed Washington.

Basso, R.T.; Urnau R.M.; Caroline Brandalize, Márcia R. Simões. 2013. Extração e Caracterização de Colágeno Obtido de Peles do Processamento de Tilápia. III Encontro Paranaense de Engenharia e Ciência Toledo – Paraná.

Bhagwat, P.K. & Dandge, P.B. 2016. Isolation, characterization and valorizable applications of fish scale collagen in food and agriculture industries. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 7: 234- 240.

Bligh, E. G.; Dyer, W. J. A. 1959. Rapid method of total lipid extraction and purification. *Canadian Journal of Biochemistry and Physiology*, Ottawa, v. 46, n. 8, p. 31-37.

Bueno, C. M.; Alvim, I. D.; Koberstein, T. C. R. D.; Portella, M. C.; Grosso, C. 2011. Produção de gelatina de pele de tilápia e sua utilização para obtenção de micropartículas contendo óleo de salmão. *Brazilian Journal of Food Technology*, Campinas, v. 14, n. 1, p. 65-73.

Chen, J., Li, L., Yi, R., Xu, N., Gao, R., & Hong, B. 2016. Extraction and characterization of acid-soluble collagen from scales and skin of tilapia (*Oreochromis niloticus*). *LWT – Food Science and Technology*, 66, 453–459.

Cho, J.K., Jin, Y.G., Rha, S.J., Kim, S.J. & Hwang, J.H. 2014. Biochemical characteristics of four marine fish skins in Korea. *Food Chemistry*, 159: 200–207.

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., Zhang, J., Du, X., Yao, X., & Konno, K. 2009. Properties of collagen from skin, scale and bone of carp (*Cyprinus carpio*). *Food Chemistry*, 112, 702–706.

Ferraro, V., Anton, M. & Santé-Lhoutellier, V. 2016. The “sisters”  $\alpha$ -helices of collagen, elastin and keratin recovered from animal by-products: Functionality, bioactivity and trends of Application. *Trends in Food Science & Technology*, 51: 65-75.

Franco, M. L. R. S.; Franco, N. P.; Gasparino, E.; Dorado, D. M.; Prado, M.; Vesco, A. P. D. 2013. Comparação das peles de Tilápia do Nilo, Pacu e Tambaqui: histologia, composição e resistência. *Archivos de Zootecnia*, v. 62, n. 237, p. 21-32.

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.

Gómez-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.

Haug, I. J.; Draget, K. I.; Smidsrød, 2004. O. Physical and rheological properties of fish gelatin compared to mammalian gelatin. *Food Hydrocolloids*. v. 18, p. 202-213.

Hoinacki, E. 1989. Peles e couros: origens, defeitos e industrialização. 2. ed. Porto Alegre: Editora Henrique d'Ávila Bertaso.

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.

Jamilah, B., Umi Hartina, M.R., Mat Hashim, D. & Sazili, A.Q. 2013. Properties of collagen from barramundi (*Lates calcarifer*) skin. *International Food Research Journal*, 20(2): 835-842.

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

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

Kittiphattanabawon, P., Benjakul, S., Visessanguan, W., Nagai, T., & Tanaka, M. 2005a. Characterisation of acid-soluble collagen from skin and bone of bigeye snapper (*Priacanthus tayenus*). *Food chemistry*, 89(3), 363-372.

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

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

LUNELLI, T. 2015. Reciclagem de resíduos do processamento de tilápia (*Oreochromis niloticus*) visando obter hidrolisado proteico como coproduto. 76 p., Dissertação (Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz) Universidade de São Paulo, Piracicaba.

Masilamani, D., Madhan, B., Shanmugam, G., Palanivel, S. & Narayan, B. 2016. Extraction of collagen from raw trimming wastes of tannery: a waste to wealth approach. *Journal of Cleaner Production*, 113: 338-344.

Muyonga, J. H.; Cole, C. G. B.; Duodu, K. G. 2004. Extraction and physicochemical characterisation of Nile perch (*Lates niloticus*) skin and bone gelatin. *Food Hydrocolloids*, v. 18, p. 581–592.

Ogawa, M., Moody, M. W., Portier, R. J., Bell, J., Schexnayder, M. A., & Losso, J. N. 2003. Biochemical properties of black drum and sheepshead seabream skin collagen. *Journal of Agricultural and food Chemistry*, 51, 8088–8092.

Oliveira, V.M., Assis, C.R.D., Herculano, P.N., Cavalcanti, M.T.H., Bezerra, R.S. & Porto, A.L.F. 2017a. Collagenase from smooth weakfish: extraction, partial purification, characterization and collagen. *Boletim do Instituto de Pesca*, 43(1): 52-64.

Oliveira, V.M., Carneiro Cunha, M.N., Assis, C.R.D., Nascimento, T.P., Herculano, P.N., Cavalcanti, M.T.H. & Porto, A.L. 2017b. Colagenases de pescado e suas aplicações industriais. *Pubvet*, 11(3): 243-255.

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.

Petibois, C., 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.

PEIXE BR 2018 Anuário peixe BR da piscicultura 2018. Associação Brasileira da Piscicultura. São Paulo- SP.

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.

SANTOS, M. F. G. 2011. Produção de hidrolisados de proteína de pescado (HPP) a partir de subprodutos da indústria do pescado de Peniche – Aplicações.

Silva, J. F. X. 2010. Produção e caracterização de hidrolisado proteico provenientes de resíduos e tilápia (*Oreochromis niloticus*). Dissertação de mestrado em recursos pesqueiros e aquicultura, Universidade Federal Rural de Pernambuco.

Singh, P., Benjakul, S., Maqsood, S., & Kishimura H. 2011. Isolation and characterization of collagen extracted from the skin of striped catfish (*Pangasianodon hypophthalmus*). *Food Chemistry*, 124:97- 105.

Sucasas, L.F.A. 2011. Avaliação do resíduo do processamento de pescado e desenvolvimento de coprodutos visando o incremento da sustentabilidade na cadeia produtiva. Tese de doutorado em ciência, Universidade de São Paulo.

Tamilmozhi, S., Anguchamy, V., & Arumugam, M. 2013. Isolation and characterization of acid and pepsin-solubilized collagen from the skin of sailfish (*Istiophorus platypterus*). *Food Research International*, 54, 1499 e 1505.

Trindade, F. 2010. Desenvolvimento de biofilmes de gelatina de pele de pescado e aplicação para conservação de frutas. Relatório Final de Atividades (Programa Institucional de Iniciação Científica). Universidade Tecnológica Federal do Paraná – Campus Francisco Beltrão.

Wang, L., An, X., Xin, Z., Zhao, L. & Hu, Q. 2007. Isolation and characterization of collagen from the skin of deep-sea redfish (*Sebastes mentella*). *Journal of Food Scienc*, 72: E450–E455.

Zhang, Q., Wang, Q., Lv, S., Lu, J., Jiang, S., Regenstein, J.M. & Lin, L. 2016. Comparison of collagen and gelatin extracted from the skins of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) and channel catfish (*Ictalurus punctatus*). Food Bioscience, 13: 41-48.

Zhang, J. J., Duan, R., Huang, L., Song, Y. J., & Regenstein, M. J. 2014. Characterisation of acid-soluble and pepsin-solubilised collagen from jellyfish (*Cyanea nozakii Kishinouye*). Food Chemistry, 150, 22 e 26.

**Tabela 1** – Composição centesimal dos resíduos do processamento da tilápia *in natura*.

<b>Constituintes</b>	<b>Carcaça</b>	<b>Resíduo de Carcaça</b>	<b>Pele</b>
<b>Umidade</b>	71,17 <sup>a</sup> ± 0,01	55,38 <sup>c</sup> ± 0,30	69,14 <sup>b</sup> ± 0,39
<b>Proteína</b>	13,13 <sup>c</sup> ± 0,36	15,36 <sup>b</sup> ± 0,76	28,21 <sup>a</sup> ± 0,40
<b>Cinzas</b>	7,63 <sup>b</sup> ± 0,66	10,57 <sup>a</sup> ± 0,38	0,17 <sup>c</sup> ± 0,04
<b>Lipídeos</b>	9,48 <sup>b</sup> ± 0,45	12,15 <sup>a</sup> ± 0,50	6,53 <sup>c</sup> ± 0,69
<b>pH</b>	7,15 <sup>b</sup> ± 0,04	7,62 <sup>a</sup> ± 0,02	6,91 <sup>c</sup> ± 0,09

\*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** – Resultados obtidos para composição centesimal dos resíduos do processamento da tilápia pré-tratados.

<b>Constituintes</b>	<b>Carcaça</b>	<b>Resíduo de carcaça</b>	<b>Pele</b>
<b>Umidade</b>	75,98 <sup>a</sup> ± 0,48	73,35 <sup>b</sup> ± 0,17	76,48 <sup>a</sup> ± 0,37
<b>Proteína</b>	14,59 <sup>c</sup> ± 0,76	22,14 <sup>a</sup> ± 0,95	19,56 <sup>b</sup> ± 0,83
<b>Cinzas</b>	0,17 <sup>a</sup> ± 0,19	0,14 <sup>a</sup> ± 0,10	0,04 <sup>a</sup> ± 0,01
<b>Lipídeos</b>	1,12 <sup>b</sup> ± 0,10	2,88 <sup>a</sup> ± 0,26	2,80 <sup>a</sup> ± 0,11

\*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 3** – Resultados obtidos para composição centesimal dos colágenos dos resíduos do processamento da tilápia.

Constituintes	C <sub>col</sub>	RC <sub>col</sub>	P <sub>col</sub>
<b>Umidade</b>	10,29 <sup>a</sup> ± 0,07	8,00 <sup>b</sup> ± 0,38	7,09 <sup>b</sup> ± 0,79
<b>Proteína*</b>	87,75 <sup>b</sup> ± 0,58	85,74 <sup>b</sup> ± 0,76	90,20 <sup>a</sup> ± 0,83
<b>Cinzas</b>	3,74 <sup>a</sup> ± 0,57	2,90 <sup>a</sup> ± 0,3	0,87 <sup>b</sup> ± 0,64
<b>Lipídeos</b>	1,90 <sup>ab</sup> ± 0,17	2,09 <sup>a</sup> ± 0,87	0,64 <sup>b</sup> ± 0,07
<b>pH</b>	5,97 <sup>a</sup> ± 0,07	5,18 <sup>b</sup> ± 0,13	4,74 <sup>c</sup> ± 0,50

\*O teor de proteína foi calculado pelo fator de correção 5,5 a partir do teor de nitrogênio.

\*\*Médias na mesma linha com letras iguais sobrescritas não diferem significativamente entre si pelo teste de Tukey (p<0,05).

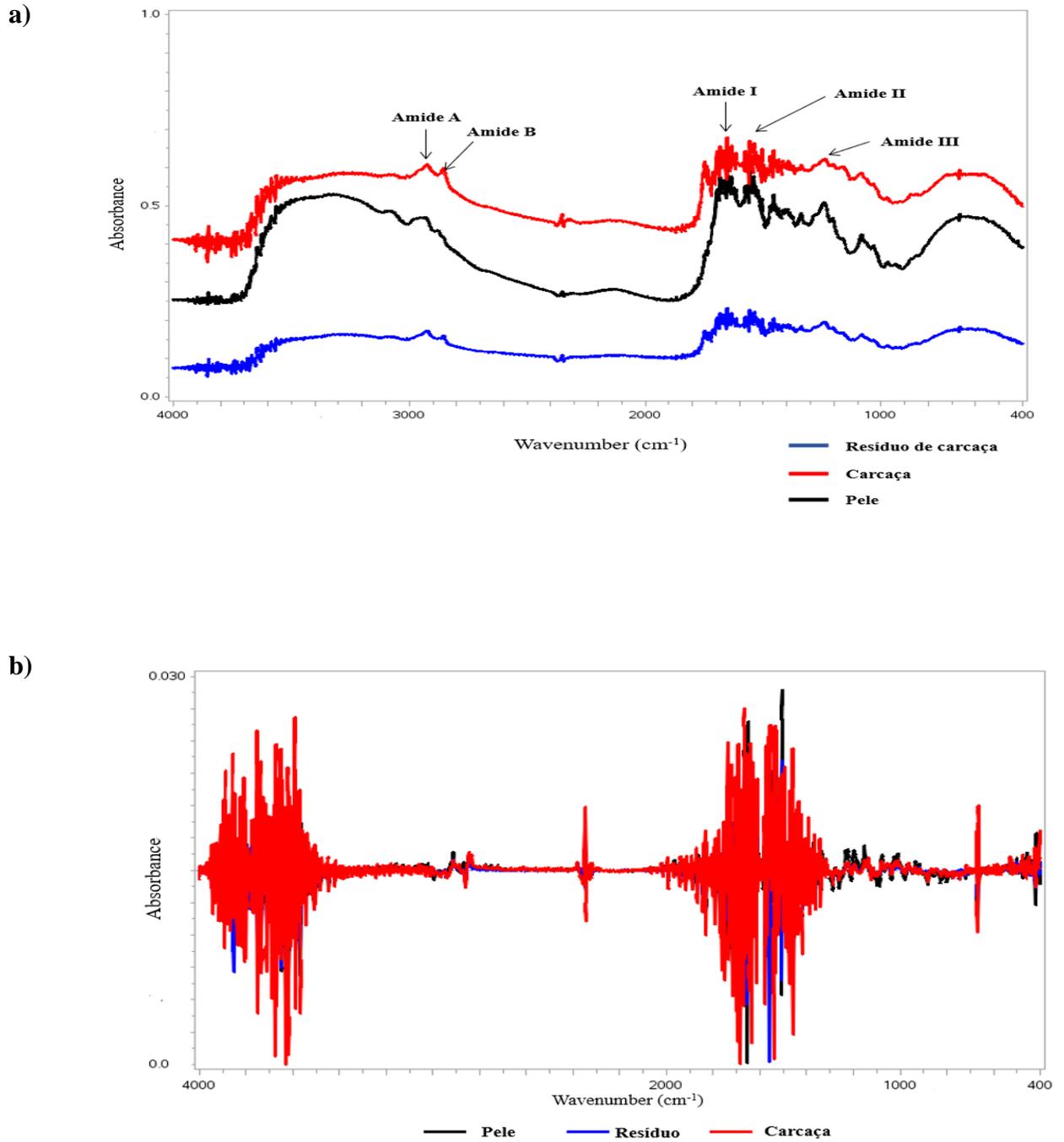
\*\*\*Valores expressos em média ± desvio padrão.

**Tabela 4** – Principais picos do espectro de infravermelho com transformada de Fourier dos resíduos do processamento da tilápia extraídos com pepsina.

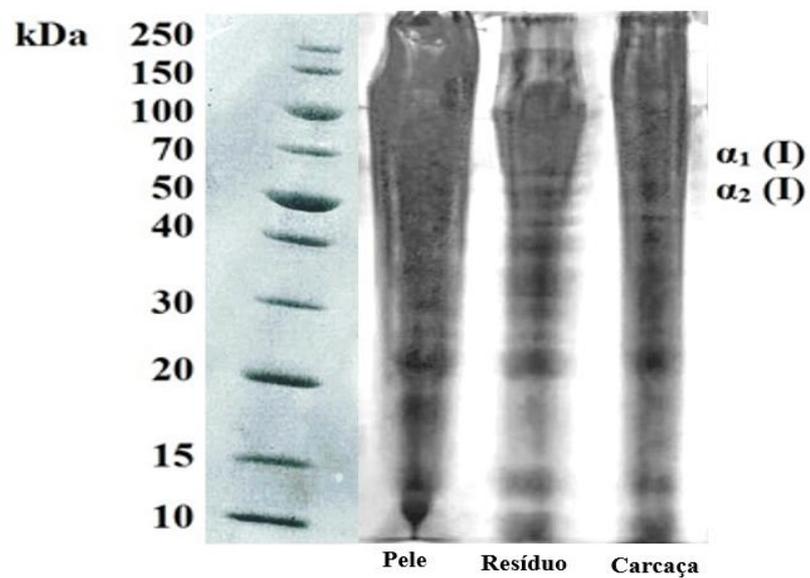
Região	Número de onda do pico (cm <sup>-1</sup> )	Atribuição	Referência
Amida A	3325	Vibração de alongamento N-H acoplada com ligação H	Sai and Babu (2001)
Amida B	2924	Estiramento assimétrico de CH <sub>2</sub>	Abe and Krimm (1972)
-	2852	Alongamento assimétrico CH <sub>3</sub> principalmente proteína	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)

Fonte: Adaptada Shimidt M.M., 2018.

**Figura 1 – a)** Espectro de FTIR e **b)** Segunda derivada do espectro dos colágenos dos resíduos do processamento de tilápia.



**Figura 2** – Eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) dos colágenos dos resíduos do processamento da tilápia extraído com pepsina.



4.2 Artigo II

**EFEITOS DO BRANQUEAMENTO NAS PROPRIEDADES DOS  
COLÁGENOS DE TILÁPIA (*Oreochromis Niloticus*)**

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

(Formatado conforme as normas da revista)

## COLÁGENO DE TILÁPIA

### **Efeitos do branqueamento nas propriedades dos colágenos de tilápia (*Oreochromis Niloticus*)**

Andrine Menna da Fontoura<sup>1\*</sup>, Ernesto H. Kubota<sup>1</sup>, Renius O. Mello<sup>1</sup>, Ivo M. Demiate<sup>2</sup>, Rosa C. P. Dornelles<sup>1</sup>

Scientific section: Processing and Products

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

<sup>2</sup> State University of Ponta Grossa, Department of Food Engineering, Avenida  
General Carlos Cavalcanti, 4748, 84030-000, Ponta Grossa PR, Brazil.

\*Corresponding author: Andrine M. Fontoura. Address: Rua Riachuelo, nº 60, apto  
304, 97050-010, centro, Santa Maria, Rio Grande do Sul, Brazil, Tel: +55 55 9 99095260.

E-mail: andrine.fontoura@gmail.com

## RESUMO

O Brasil é o quarto maior produtor de tilápia do mundo, gerando um grande excesso de resíduos do processamento desses pescados. Os resíduos do processamento da tilápia podem chegar a 70% após o processo de filetagem, o que vem preocupando os órgãos responsáveis por esses resíduos, pois, vem causando grandes danos ao meio ambiente. Os resíduos do processamento da tilápia se tornam uma alternativa para agregar valor a esses resíduos. O objetivo deste estudo foi avaliar os efeitos tecnológicos no pré-tratamento com peróxido de hidrogênio no branqueamento em colágeno de tilápia, solúveis em pepsina extraído dos resíduos do processamento de tilápia (carcaça, resíduo da carcaça e pele). Os colágenos obtidos apresentaram um alto rendimento  $C_{col}$  (8,05% com e 8,75% sem branqueamento),  $RC_{col}$  (15,92% com e 16,93% sem branqueamento) e  $P_{col}$  (26,36 com e 27,5% sem branqueamento). Os colágenos apresentaram elevada solubilidade em pH ácido e um elevado índice da atividade emulsificante e outras propriedades mostraram que são praticamente constituídos de colágeno do tipo I e a estrutura helicoidal tripla estava conservada, o que foi confirmado pelas análises de eletroforese (SDS-PAGE).

**Palavras-chave:** Colágeno; Resíduo da carcaça; Carcaça; Pele; Propriedades; Eletroforese.

## **Introdução**

A aquicultura brasileira vem crescendo nos últimos anos, a pesca que é uma atividade praticada desde a antiguidade, constitui uma importante fonte de renda vem aumentando e gerando altos níveis de resíduos (MPA, 2017). A tilápia é uma das espécies mais cultivadas no país por possuir grande capacidade de adaptação aos sistemas de produção, rápido crescimento e possuir uma alta reprodução.

Um dos maiores problemas na cadeia produtiva da piscicultura é a grande quantidade de resíduos gerados após a filetagem. No caso da tilápia, os resíduos chegam a 70% durante a produção de filé, sendo distribuídos em cabeça, carcaça, vísceras e pele, fazendo com que o interesse por soluções e aproveitamento destes resíduos seja cada vez maior (Bueno et al., 2011). De acordo com Aguiar et al. (2014) os resíduos do processamento da aquicultura são ricos em óleos, minerais, enzimas, pigmentos, proteínas e entre outros.

O colágeno é a mais abundante proteína de mamíferos, representa cerca de 20-30% do total de proteínas corporais (Zeugolis & Raghunath, 2011) e constitui o principal elemento estrutural de órgãos e tecidos de vertebrados (Senaratne et al., 2006; Uitto et al., 2008; Gelse et al., 2003; Chung & Uitto, 2010).

O colágeno do tipo I é encontrado na forma abundante principalmente em peixes de água doce e marinhos e sua extração pode se dar através da pele, escamas e outras partes do corpo do animal (Oliveira et al. 2017).

Os colágenos dos resíduos do processamento da tilápia apresentaram coloração escura, não possuindo interesse no mercado devido sua coloração. Diante disso foi realizado um branqueamento na etapa de pré-tratamento dos colágenos, com peróxido de hidrogênio.

Há poucos estudos utilizando o peróxido de hidrogênio no branqueamento de colágenos. No entanto, os pigmentos dos resíduos de pescados podem ocasionar problema na cor dos colágenos, o branqueamento é uma alternativa que pode ser realizado antes extração dos colágenos. O peróxido de hidrogênio um oxidante que é amplamente utilizado como agente de branqueamento no processamento de frutos do mar (Kolodziejska, Sikorski, & Niecikowska, 1999; Thanonkaew et al. 2008).

Kolodziejska et al. (1999) relataram que a imersão da pele de lula em peróxido de hidrogênio a 1% em NaOH 0,01 M por 48h melhora a cor dos colágenos extraídos. A decomposição de  $H_2O_2$  em solução aquosa ocorre por dissociação e homolítica clivagem das ligações O-H ou O-O, com a formação de produtos altamente reativos: o ânion hidroperoxil ( $HOO^-$ ) e o hidroperoxil (HOO) e hidroxila (OH) radicais, que podem reagir com muitas substâncias, incluindo cromatóforos (Perkins, 1996).

A utilização dos resíduos do processamento de pescados é ecologicamente recomendável em função do elevado teor de matéria orgânica depositada no meio ambiente, se os mesmos não forem reaproveitados. Uma das aplicações é a extração de colágeno a partir de escamas e peles para indústrias alimentícias e farmacêuticas (Vidotti & Gonçalves, 2006).

Há obtenção de colágenos e seus derivados dos resíduos dos processamentos, sugerem serem uma opção para reduzir os impactos ambientais causados pelos resíduos das indústrias de pescados tendo em vista o aproveitamento destes resíduos e o emprego dos colágenos e seus derivados na indústria alimentícia, farmacêutica e cosmética.

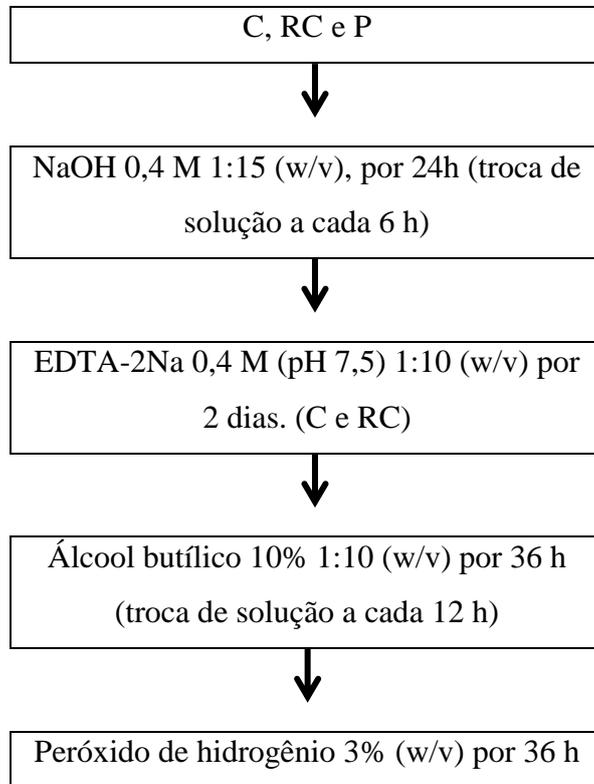
O presente estudo teve como objetivo avaliar os efeitos do peróxido de hidrogênio no branqueamento dos colágenos, e nas propriedades dos colágenos dos resíduos do processamento de tilápia (*Oreochromis niloticus*).

#### **Material e métodos**

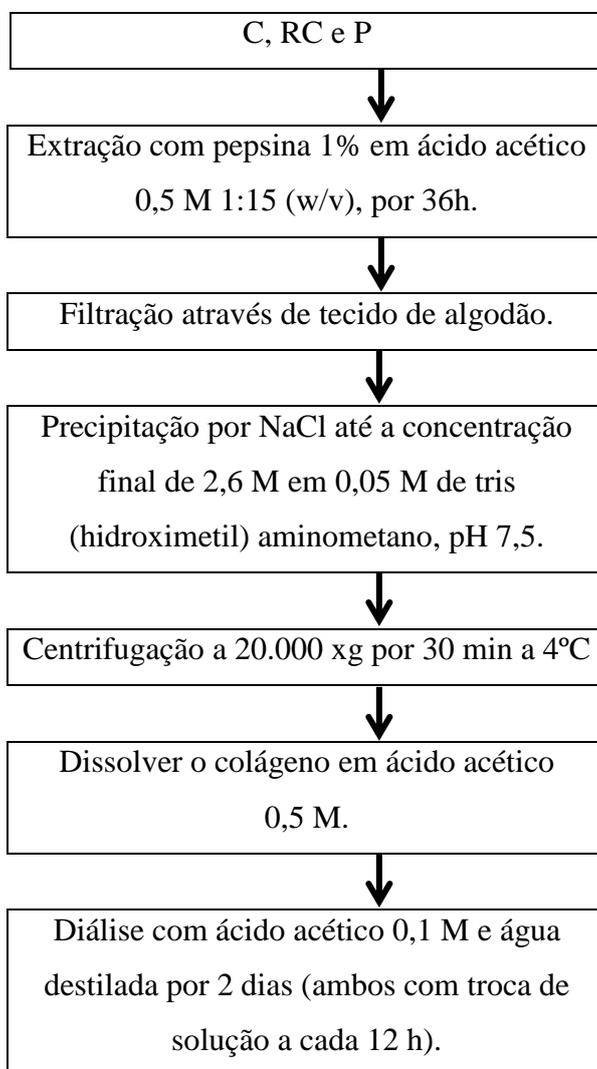
A matéria-prima congelada carcaça (C), resíduo de carcaça (RC) e pele (P) foram doados pela Cooperativa Agroindustrial Consolata (Copacol), unidade de Cafelândia (PR). A matéria-prima foi armazenada sob congelamento em freezer (Metalfrio, VF50F) a -22 °C.

*Obtenção do colágeno*

**Pré-tratamento:**



### Extração do colágeno:



Após o pré-tratamento dos resíduos do processamento da tilápia os colágenos foram extraídos com pepsina seguindo a metodologia proposta por Kittiphattanabawon et al. (2010) com modificações. Foi adicionado ácido acético 0,5 M, contendo a enzima pepsina (extraída da mucosa gástrica porcina, em pó,  $\geq 400$  unidades/mg de proteína, Alphatec), na proporção 1:7 enzimas/proteínas, com razão sólido/solvente de 1:15 (p/v) em Erlenmeyer.

A solução contendo pepsina e ácido acético sob agitação contínua por 36h, seguido de filtração através de tecido de algodão. Todos os procedimentos do pré-tratamento e extração foram realizados sob agitação em Incubadora Shaker (Solab SL-223, Piracicaba, Brasil) a 160 rpm a uma temperatura de 4 °C.

Após o pré-tratamento e filtração, 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 10.000 xg por 30 minutos, em centrífuga refrigerada (Centrifuga Eppendorf 5804/5804 R) a 4 °C, posteriormente foi realizada a diálise em membrana de celulose (Typical molecular weight cut-off 14.000 KDa, Sigma, St. Louis, USA), com ácido acético 0,1 M e água destilada por dois dias, ambos a 4 °C sob agitação, com troca da solução a cada 12 horas. Após todo o processo de extração do colágeno, foi congelado em freezer (Metalfrio, VF50F) a -22 °C e liofilizado em liofilizador (Terroni, LS 3000, São Carlos, Brasil).

#### *Caracterização dos colágenos*

##### *Composição centesimal*

A composição centesimal dos colágenos foi determinada seguindo a metodologia da AOAC (1996) para protídios, umidade, cinzas, pH (potencial hidrogeniônico). E para lipídeos seguiu a metodologia de extração a frio, descrita por Bligh & Dyer (1959).

### *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 transmitância em pastilha de KBr no intervalo de 400 a 4.000  $\text{cm}^{-1}$ . Foram realizadas 16 varreduras por espectro e 2  $\text{cm}^{-1}$  de resolução.

### *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 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  $\mu\text{L}$  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  $\mu\text{L}$  de acetona 90% gelada e centrifugado nas mesmas condições, removendo novamente o sobrenadante. O precipitado foi ressuspenso com 50  $\mu\text{L}$  do tampão da amostra com 5% de  $\beta$ -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 do colágeno*

##### *Solubilidade*

A solubilidade foi determinada de acordo com a metodologia 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 xg 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 com a % de aumento de volume baseando-se no volume inicial e após a formação de espuma, como mostra a equação abaixo:

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

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:

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

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*

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 xg 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:

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

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

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 suína, em pó,  $\geq 400$  unidades/mg de proteína, Sigma, St. Louis, USA) por mL de HCl 0,1N e adicionou-se 15 mL desta solução a amostra. Após adicionou-se 0,5 mL de solução de tiomersal 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 0,2N, utilizando um potenciômetro digital (MS Tecnoyon, 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 xg 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 dos colágeno foram 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 N° 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 dos colágenos 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 ®9.0 (StatSoft Inc., Tulsa, OK, EUA).

## **Resultados e discussão**

### *Composição centesimal dos colágenos*

Os valores médios da composição centesimal dos colágenos obtidos dos resíduos do processamento de tilápia (carcaça, resíduo de

carcaça e pele) estão apresentados na Tabela 1. Pode-se observar a proteína foi o principal constituinte dos colágenos, a pele foi a apresentou maior teor de proteína (90,20 e 88,78% sem e com branqueamento, respectivamente). Sendo semelhantes aos valores descritos por Basso et al. (2013) e Muyonga et al. (2004) que encontraram 91,24 e 92,8% de proteína, respectivamente. A carcaça e o resíduo de carcaça apresentaram valores próximos aos encontrados por Basso et al. (2013) e Muyonga et al. (2004).

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

Pode-se observar na Figura 1 a SDS-PAGE dos diferentes tratamentos dos colágenos dos resíduos do processamento de tilápia 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 cadeias  $\alpha_1$  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 os pré-tratamentos com branqueamento em C2, RC2 e P2 não levou ao aparecimento de peptídeos de baixo peso molecular, comprovando que a adição do peróxido de hidrogênio não afetou negativamente a integridade dos colágenos, que mantiveram a estrutura de tripla hélice intacta. A estrutura dos colágenos preservadas se devem as concentrações adicionadas nos colágenos de peróxido de hidrogênio serem baixas.

## *Avaliação das propriedades dos colágeno*

### *Solubilidade*

A Figura 2 apresenta a solubilidade (%) dos colágenos obtidos dos resíduos do processamento da tilápia, com e sem adição de peróxido de hidrogênio. Os colágenos mostraram uma elevada solubilidade em pH baixo, Jongjareonrak et al. (2005) encontraram resultados parecidos para colágenos na pele de *Lutjanus vitta*. Entretanto, Vojdani (1996) em pH neutros e alcalinos encontrou queda na solubilidade, quando o pH é menor ou maior do que pI, a carga líquida de moléculas de proteína é maior e a solubilidade é aumentada pelas forças de repulsão entre cadeias.

A solubilidade mais elevada para os colágenos dos resíduos do processamento de tilápia, foi em pH 2 para a C<sub>col</sub> e P<sub>col</sub> com e sem branqueamento, e em pH 1 para RC<sub>col</sub>, com e sem branqueamento.

Com o aumento do pH, de 4,0 a 9,0, observou-se redução na solubilidade, sendo a menor solubilidade observada encontrada em pH 10 para ambos os colágenos, em pH alcalino, 6,0 ocorreu um leve aumento da solubilidade. Ambos os colágenos não mostraram diferença significativa em relação a solubilidade.

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 2 podemos observar os resultados encontrados para formação de espuma (CFE) e estabilidade da espuma (EE) dos colágenos dos resíduos do processamento de tilápia com e sem branqueamento. Os colágenos da pele da tilápia em concentrações 0,5 e 1% não formaram espuma (dados não apresentados), devido as grandes concentrações de proteínas, que não conseguiram migrar para superfícies das bolhas de ar, não tendo formação na espuma.

Na concentração 0,25% podemos observar que em ambos colágenos houve formação de espuma, isso se deve a maior concentração de proteínas migrando para a superfície das bolhas de ar, levando uma formação mais rápida de espuma e uma maior estabilidade da espuma (Zeng et al. 2013).

De acordo com Giménez et al. (2009), para hidrolisados de gelatina na pele de linguado e lula, a concentração na CFE aumentou cerca de 6-7% para 32-34%, o que não foi o caso nos colágenos dos resíduos do processamento da tilápia.

### *Propriedades emulsificantes*

O índice da atividade emulsificante (EAI) encontrado nos colágenos dos resíduos do processamento da tilápia estão apresentados na Tabela 3, foram superior aos encontrados por Aewsiri et al. (2009) na gelatina de ossos bovino (1%), 28,27 m<sup>2</sup>/g e na 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).

Pode-se observar na Tabela 3 que os colágenos RC<sub>col</sub> e P<sub>col</sub> com branqueamentos, mostraram maior instabilidade da emulsão que os sem branqueamento, pode-se notar que o peróxido de hidrogênio não interfere nas propriedades da EAI.

Possui poucos estudos sobre as propriedades emulsificantes e de formação de espuma da gelatina de pescado (Dickinson e Lopez, 2001; Surh et al., 2006). A versatilidade das propriedades emulsificantes e de formação de espuma da gelatina é particularmente valorizado em produtos como os pós emulsificantes (Kloui et al., 1970).

Nos colágenos dos resíduos do processamento da tilápia, suas características de formação de superfície ativa e de películas podem ser exploradas e estudadas durante o processo de emulsificação. Em geral os estudos sobre as propriedades emulsionantes e de formação de espuma de gelatina de pescados são muito limitados em comparação com o número de estudos sobre as suas propriedades de gelificação.

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 diminuí. No entanto, os resultados obtidos para os os resíduos do processamento da tilápia não concordam com estes estudos.

Essa discordância pode ser resultado de diferentes composições e distribuições de aminoácidos, os quais já são encontrados em alguns estudos (Pacheco-Aguilar et al., 2008; Baharuddin et al., 2016).

#### *Digestibilidade in vitro*

Os colágenos da pele de tilápia extraídos com pepsina apresentaram baixa digestibilidade *in vitro*, pode-se observar na Tabela 4, quando comparada a outras proteínas como a albumina (98,3%) (Costa et al., 2007) e a caseína (93,82%) (Neves et al., 2006). Podemos observar que os colágenos com branqueamentos não interferiram na digestibilidade.

Há poucos estudos sobre a digestibilidade *in vitro* em colágenos de pescados. A baixa digestibilidade obtida nos colágenos 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 dos colágenos.

#### *Viscosidade*

A viscosidade da solução dos colágenos encontra-se na Tabela 5. Pode-se observar que houve diferença significativa entre a viscosidade dos colágenos  $C_{col}$ ,  $RC_{col}$  e  $P_{col}$ . Os menores teores de viscosidades foram encontrados em temperatura de 50°C para ambos os colágenos, e em temperaturas menores, a 25°C os colágenos demonstraram uma elevada viscosidade.

Nos colágenos obtido da escamas de tilápia (*Oreochromis niloticus*) Hung et al. (2016) encontraram uma viscosidade que variou de 8,1 a 10,2 cP, medida em 6,67% de concentração e 60 ° C, que excedeu a viscosidade encontrada por Wangtueai & Noomhorm (2009) na gelatina de lagarto (*Saurida spp.*) que variou de 3,14 a 5,80 cP, medido a 6,67% de concentração e 25° C.

É possível observar na Tabela 5, uma diminuição significativa ( $p < 0,05$ ) da viscosidade nas amostras dos colágenos devido o aumento da temperatura. A elevação da temperatura pode ocasionar a quebra gradual das ligações de hidrogênio do colágeno, e conseqüentemente, a estrutura de tripla hélice é convertida em uma conformação aleatória, causando alterações nas propriedades físicas do colágeno, como por exemplo na viscosidade (Usha & Ramasami, 2004).

## **CONCLUSÃO**

Os colágenos dos resíduos do processamento da tilápia com e sem branqueamento, apresentaram um efeito positivo quanto as suas propriedades tecnológicas.

O branqueamento não afetou a integridade dos colágenos que foi comprovado pela a análise de eletroforese. Ambos os colágenos, com e sem branqueamentos apresentaram diminuição da viscosidade com o aumento da temperatura, capacidade de formação de espuma, o índice de atividade emulsificante da pele e do resíduo de carcaça não sofreram influência do branqueamento, tanto do branqueado quanto o sem branqueamento

diminuía.

A obtenção desses resíduos do processamento de tilápia comprovaram ser uma fonte tecnologicamente viável para extração de colágeno, mostrando-se como alternativa aos colágenos de mamíferos e com potencial de aplicação industrial, tornando possível a agregação de valor.

O branqueamento dos colágenos no pré-tratamento não altera suas propriedades tecnológicas, sendo uma alternativa para os colágenos de pescados que possuem pigmentos escuros.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Aguiar, G.P.S.; Limberger, G.M. e Silveira, E.L. 2014. Alternativas tecnológicas para o aproveitamento resíduos provenientes da industrialização de pescados. Rev Eletr UNIVAR, 1: 219-225.

AOAC - Association of Official Analytical Chemists. 1996. Official methods of analysis of the Association Analytical Chemists. 16<sup>th</sup> ed Washington – DC.

Bligh, E. G.; Dyer, W. J. A. 1959. Rapid method of total lipid extraction and purification. Canadian Journal of Biochemistry and Physiology, Ottawa, v. 46, n. 8, p. 31-37.

Bueno, C. M.; Alvim, I. D.; Koberstein, T. C. R. D.; Portella, M. C.; Grosso, C. 2011. Produção de gelatina de pele de tilápia e sua utilização para obtenção de micropartículas contendo óleo de salmão. Brazilian Journal of Food Technology, Campinas, v. 14, n. 1, p. 65-73.

Cho, J.K., Jin, Y.G., Rha, S.J., Kim, S.J. & Hwang, J.H. 2014. Biochemical characteristics of four marine fish skins in Korea. Food Chemistry, 159: 200–207.

Chung, H. J. & Uitto, J. 2010. Type VII Collagen: The Anchoring Fibril Protein at Fault in Dystrophic Epidermolysis Bullosa. *Dermatologic Clinics*, 28(1): 93-105.

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

FAO. 2017. The state of world fisheries and aquaculture. *The State of World Fisheries and Aquaculture 2016*, 160p.

Gelse, K., Pöschl, E. & Aigner, T. 2003. Collagens—structure, function, and biosynthesis. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 55:1531-1546.

Jongjareonrak, A., Benjakul, S., Visessanguan, W., Nagai, T., & Tanaka, M. 2005. Isolation and characterisation of acid and pepsin-solubilised collagens from the skin of brownstripe red snapper (*Lutjanus vitta*). *Food Chemistry*, 93, 475–484.

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.

Kittiphattanabawon, P.; Benjakul, S.; Visessanguan, W., Shahidi, F. 2010. Isolation and characterization of collagen from the cartilages of

brownbanded bamboo shark (*Chiloscyllium punctatum*) and blacktip shark (*Carcharhinus limbatus*). *Food Science and Technology*, 43:792-800.

Kolodziejska, I., Sikorski, Z. E., & Niecikowska, C. 1999. Parameters affecting the isolation of collagen from squid (*Illex argentinus*) skin. *Food Chemistry*, 66, 153–157.

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

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.

MPA. Boletim Estatístico da Pesca e Aquicultura.2017. Ministério da Pesca e Aquicultura.

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

Perkins, W. S. 1996. Advances made in bleaching practice. Alexander Technique International, 4, 92–94

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.

Singh, P., Benjakul, S., Maqsood, S., & Kishimura, Hx. 2011. Isolation and characterization of collagen extracted from the skin of striped catfish (*Pangasianodon hypophthalmus*). Food Chemistry, 124:97- 105.

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

Thanonkaew, A., Benjakul, S., Visessanguan, W., & Decker, E. A. 2008. The effect of antioxidants on the quality changes of cuttlefish (*Sepia*

*pharaonis*) muscle during frozen storage. LWT-Food Science and Technology, 41, 161–169.

Uitto, J., Chu, M.L., Gallo, R. & Eisen, A.Z. 2008. Collagen, elastic fibers, and extracellular matrix of the dermis, In: Wolff K, Goldsmith LA, Katz SI, Gilchrest BA, Paller AS, Leffell DJ (Ed). Fitzpatrick's dermatology in general medicine. 7th ed. New York: McGraw-Hill.

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.

Vidotti, R. M.; Gonçalves, G. S. 2006. Produção e caracterização de silagem, farinha e óleo de tilápia e sua utilização na alimentação animal. Instituto de Pesca, São José do Rio Preto.

Vojdani, F. 1996. Solubility. In G. M. Hall (Ed.), Methods of testing protein functionality (pp. 11–60). Great Britain: St. Edmundsbury Press.

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

Zeugolis, D.I. & Raghunath, M. 2011. Collagen: Materials Analysis and Implant Uses. In: P. Ducheyne, K. Healy, D. Hutmacher, D. Grainger, C. Kirkpatrick (Eds.). *Comprehensive Biomaterials* (pp. 261- 278). Ed. Elsevier.

**Tabela 1-** Composição centesimal para os resíduos do processamento de tilápia: carcaça, resíduo da carcaça e pele, com e sem branqueamento.

Constituintes	Carcaça		Resíduo da Carcaça		Pele	
	Sem branqueamento	Com branqueamento	Sem branqueamento	Com branqueamento	Sem branqueamento	Com branqueamento
<b>Umidade</b>	10,29 <sup>a</sup> ± 0,07	10,02 <sup>a</sup> ± 0,55	8,0 <sup>bc</sup> ± 0,38	9,36 <sup>ad</sup> ± 0,34	7,07 <sup>b</sup> ± 0,79	8,42 <sup>cd</sup> ± 0,30
<b>Proteína*</b>	87,75 <sup>cd</sup> ± 0,58	84,12 <sup>ab</sup> ± 0,39	85,74 <sup>bc</sup> ± 0,76	82,92 <sup>a</sup> ± 0,75	90,20 <sup>e</sup> ± 0,83	88,78 <sup>d</sup> ± 0,47
<b>Cinzas</b>	3,74 <sup>a</sup> ± 0,57	3,88 <sup>a</sup> ± 0,15	2,9 <sup>a</sup> ± 0,34	3,11 <sup>a</sup> ± 0,67	0,88 <sup>b</sup> ± 0,08	0,82 <sup>b</sup> ± 0,01
<b>Lipídeos</b>	1,89 <sup>a</sup> ± 0,17	1,94 <sup>a</sup> ± 0,06	2,09 <sup>a</sup> ± 0,87	2,08 <sup>a</sup> ± 0,32	0,64 <sup>b</sup> ± 0,07	0,65 <sup>b</sup> ± 0,19
<b>pH</b>	5,97 <sup>c</sup> ± 0,13	5,37 <sup>bc</sup> ± 0,07	5,19 <sup>ab</sup> ± 0,14	5,26 <sup>ab</sup> ± 0,08	4,74 <sup>a</sup> ± 0,5	5,00 <sup>ab</sup> ± 0,03

\*O teor de proteína foi calculado pelo fator de correção 5,5 a partir do teor de nitrogênio.

\*\* Sem e com adição de peróxido de hidrogênio.

<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) e estabilidade da espuma (EE) dos colágenos C<sub>col</sub>, RC<sub>col</sub> e P<sub>col</sub>, extraídos com pepsina na concentração de 0,25%.

Amostra	CFE (%)	EE (%)					Equação
		1 min	5 min	10 min	30 min	60 min	
C <sub>col</sub> Sem branq.	23,16 <sup>c</sup> ± 0,76	95,69	93,28	90,83	88,08	81,77	
C <sub>col</sub> com branq.	26,33 <sup>b</sup> ± 0,75	89,31	88,67	87,96	80,88	79,08	
RC <sub>col</sub> sem branq.	12,17 <sup>b</sup> ± 0,58	96,13	95,09	92,55	88,96	83,43	
RC <sub>col</sub> com branq.	11,83 <sup>b</sup> ± 0,53	95,37	94,87	92,95	81,67	71,90	
P <sub>col</sub> sem branq.	25,83 <sup>a</sup> ± 0,51	96,55	94,95	92,21	87,24	83,22	
P <sub>col</sub> com branq.	26,02 <sup>a</sup> ± 0,83	96,12	93,19	92,68	86,95	82,34	
<b>Médias</b>		94,87 <sup>A</sup>	93,34 <sup>A</sup>	91,53 <sup>A</sup>	85,63 <sup>B</sup>	80,29 <sup>C</sup>	y= 94,341 – 0,2458x; (r <sup>2</sup> = 0,77)

\*Sem peróxido de hidrogênio e com adição de peróxido de hidrogênio

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

x= tempo (minutos); y= EE.

**Tabela 3** – Índice de estabilidade da emulsão (ESI) para os colágenos dos resíduos do processamento de tilápia, extraídos com pepsina na concentração de 0.25%.

	Índice de estabilidade da emulsão (m <sup>2</sup> /g)					
	<b>C<sub>col</sub> sem branq.</b>	<b>C<sub>col</sub> com branq.</b>	<b>RC<sub>col</sub> sem branq.</b>	<b>RC<sub>col</sub> com branq.</b>	<b>P<sub>col</sub> sem branq.</b>	<b>P<sub>col</sub> com branq.</b>
EAI (m <sup>2</sup> /g)	42,73	41,44	43,44	55,45	61,09	68,68
ESI (min)	9,63	9,37	9,36	9,63	9,72	9,80

**Tabela 4** – Digestibilidade *in vitro* dos colágenos dos resíduos do processamento de tilápia, extraídos com pepsina.

<b>Colágenos</b>	<b>Digestibilidade (%)</b>
<b>C<sub>col</sub> sem branq.</b>	40,07 <sup>a</sup> ± 0,71
<b>C<sub>col</sub> com branq.</b>	39,45 <sup>a</sup> ± 0,63
<b>RC<sub>col</sub> sem branq.</b>	42,59 <sup>c</sup> ± 0,34
<b>RC<sub>col</sub> com branq.</b>	40,21 <sup>a</sup> ± 0,49
<b>P<sub>col</sub> sem branq.</b>	48,21 <sup>b</sup> ± 0,32
<b>P<sub>col</sub> com branq.</b>	47,48 <sup>b</sup> ± 0,69

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

<sup>\*</sup>Valores expressos em média ± desvio padrão.

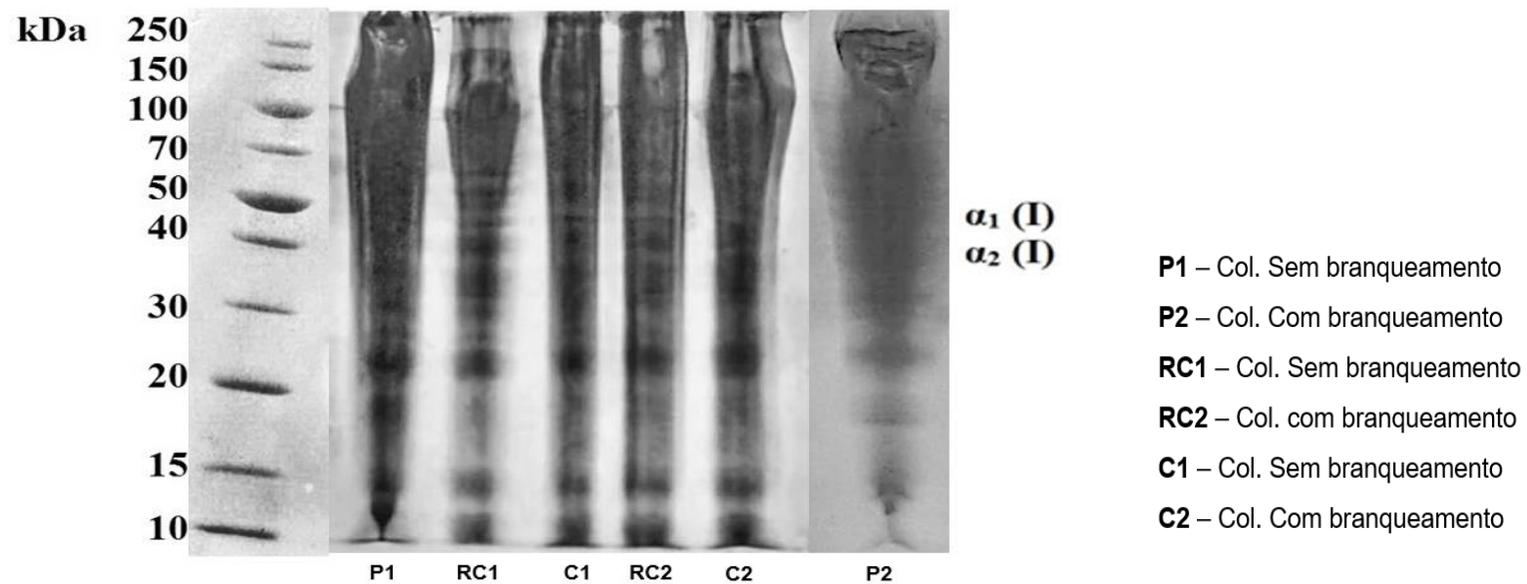
**Tabela 4** – Viscosidade dos colágenos obtidos dos resíduos do processamento de tilápia, extraídos com pepsina.

Temperatura (°C)	Viscosidade (mPa.s ou cP)					
	C <sub>col</sub> sem branq.	C <sub>col</sub> com branq.	RC <sub>col</sub> sem branq.	RC <sub>col</sub> com branq.	P <sub>col</sub> sem branq.	P <sub>col</sub> com branq.
10	12,26 <sup>a</sup> ± 0,20	9,26 <sup>b</sup> ± 0,15	12,30 <sup>a</sup> ± 0,62	12,25 <sup>e</sup> ± 0,50	14,80 <sup>c</sup> ± 0,64	10,75 <sup>b</sup> ± 0,50
25	10,47 <sup>a</sup> ± 0,32	9,62 <sup>b</sup> ± 0,09	10,40 <sup>a</sup> ± 0,17	10,57 <sup>a</sup> ± 0,22	10,42 <sup>a</sup> ± 0,15	9,17 <sup>b</sup> ± 0,22
50	8,27 <sup>a</sup> ± 0,60	8,97 <sup>a</sup> ± 0,85	8,13 <sup>a</sup> ± 0,50	9,13 <sup>a</sup> ± 0,50	7,60 <sup>a</sup> ± 0,58	8,13 <sup>a</sup> ± 0,80

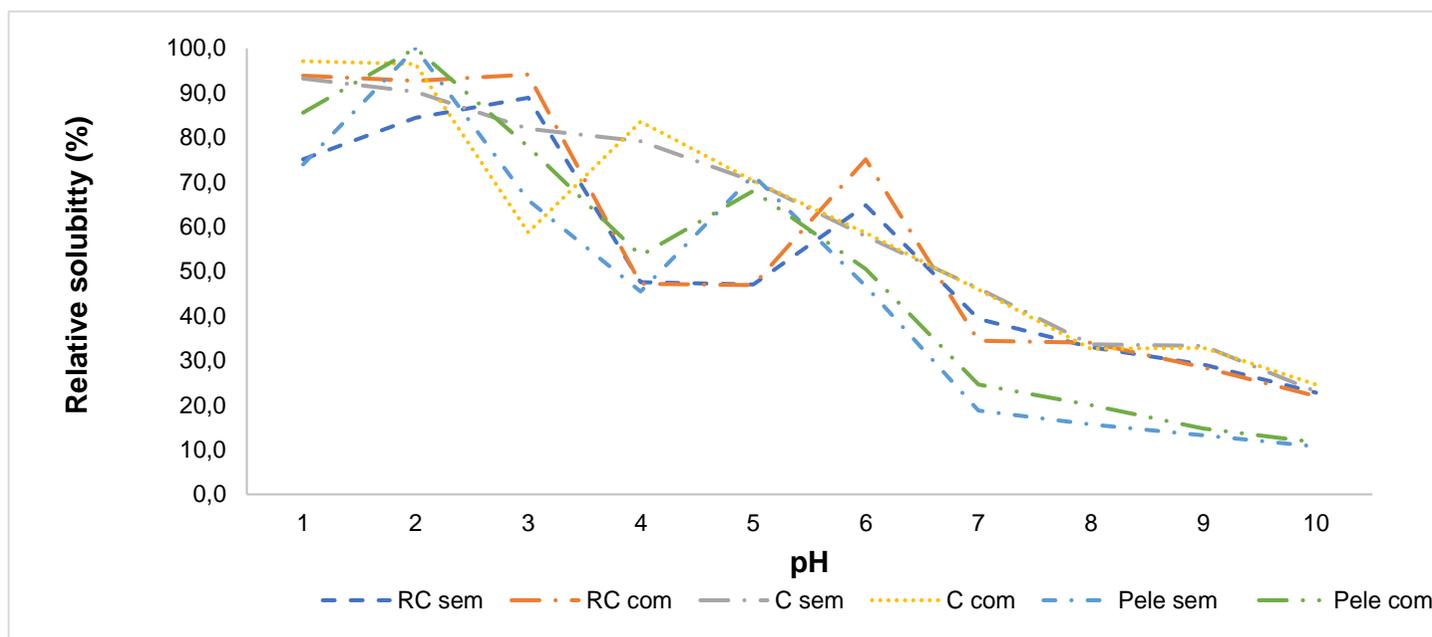
<sup>a</sup>Médias na mesma linha com letras iguais sobrescritas não diferem significativamente entre si pelo teste de Tukey (p < 0,05).

<sup>\*</sup>Valores expressos em média ± desvio padrão.

**Figura 1** - Eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) dos colágenos dos resíduos do processamento de tilápia extraídos com pepsina.



**Figura 2** - Solubilidade relativa observada (%) do colágeno dos resíduos do processamento de tilápia extraído com pepsina em função do pH.



## **5 CONSIDERAÇÕES FINAIS**

O Brasil é o quarto maior produtor mundial da tilapicultura. Em 2017 foram cultivadas 357,6 mil toneladas, obteve um desempenho 16% maior que em 2016 (IBGE, 2017). Segundo Kubitza (2015), apesar de o Brasil ser um grande produtor de frango, bovinos e suínos, a aquicultura foi o setor de carnes que apresentou maior incremento percentual em produção entre 2004 e 2014, com crescimento anual médio de 8%, contra 5,1% para bovinos, 4,1% para o frango e 2,9% para suínos. Destacando a indústria de produção de tilápia no Brasil. Enquanto a produção de peixes cresceu em torno de 10%, no período de 2004 a 2014, a tilapicultura teve um crescimento da ordem de mais de 14% (Kubitza, 2015).

Os resíduos do processamento de pescado são fontes ricas em biomoléculas, destacando-se o colágeno, um biopolímero que apresenta vantagens, como ausência de transmissão de patógenos, preocupação das fontes atuais (bovinos, suínos, entre outros), ausência de citotoxicidade e abundância. O colágeno do Tipo I é o mais abundante e altamente desejado devido as suas propriedades físico-químicas e mecânicas, tornado alvo para a produção de biomateriais para uso na engenharia de tecidos e alimentos

## **6 SUGESTÕES DE TRABALHOS FUTUROS**

Sugerimos para trabalhos futuros a hidrólise do colágeno a partir de diferentes enzimas, otimização do método de extração do colágeno proveniente do resíduo do processamento de tilápia, 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.

Avaliar metodologias com e sem ultrassom, como uma alternativa de diminuir o tempo de extração e aumentar seu rendimento. A aplicação do colágeno nativo e hidrolisado na indústria alimentícia ou farmacêutica, como uma alternativa de agregar valor aos resíduos do processamento de tilápia,

## **7 CONCLUSÃO**

Os resíduos do processamento de tilápia demonstraram serem fonte eficaz e tecnologicamente viável para a extração de colágeno, tornando-o uma alternativa para agregar valor aos resíduos gerados pela indústria de pescados no Brasil, os resíduos do processamento mostraram um bom rendimento da extração de colágeno, estrutura helicoidal conservada e boa funcionalidade.

Os pré-tratamentos com e sem peróxido de hidrogênio não interferiram na composição centesimal, propriedades dos colágenos e nem no rendimento final do colágeno. O tempo de extração com pepsina apresentou um efeito positivo em seu rendimento, quando comparado com outras metodologias de extrações.

A utilização destes resíduos é ecologicamente recomendável em função da elevada matéria orgânica depositada no meio ambiente, se os mesmos não forem aproveitados. Sendo uma boa alternativa para reduzir os impactos ambientais causados pelos rejeitos das indústrias de pescados, tendo em vista o aproveitamento destes resíduos e o emprego dos colágenos e seus derivados na indústria.

Podemos assim concluir, que os colágenos provenientes dos resíduos do processamento de tilápia são subprodutos promissores como alternativa aos colágenos convencionais, tornando uma alternativa para as indústrias alimentícias e farmacêuticas.

## 8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGUIAR, G. P. S.; GOULART, G. A. S. Produção de óleo e farinha a partir de coprodutos de pescado provenientes da bacia Tocantins-Araguaia. **Revista Eletrônica Interdisciplinar, João Pessoa**, v.1, n. 11, p. 67-71, 2014.

AGUIAR, G. P. S.; LIMBERGER, G. M.; SILVEIRA, E. L. Alternativas tecnológicas para o aproveitamento de resíduos provenientes da industrialização de pescado. **Revista Eletrônica da UNIVAR**, Florianópolis, v. 1, p. 229 – 225, 2014.

AN, B., LIN, Y-S. & BRODSKY, B. Collagen interactions: Drug design and deliver. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 97: 69-84, 2016.

BNDES. Banco Nacional de Desenvolvimento Econômico e Social. **A pesca e aquicultura Brasileira 2013**.

BOCCAFOSCHI, F.; HABERMEHL, J.; VESENTINI, S.; MANTOVANI, D. Biological performances of collagen-based scaffolds for vascular tissue engineering. **Biomaterials, Quebec City**, v. 26, p. 7410-7417, 2005.

BUENO, C. M.; ALVIM, I. D.; KOBERSTEIN, T. C. R. D.; PORTELLA, M. C.; GROSSO, C. Produção de gelatina de pele de tilápia e sua utilização para obtenção de micropartículas contendo óleo de salmão. **Brazilian Journal of Food Technology**, Campinas, v. 14, n. 1, p. 65-73, 2011.

CAVALCANTE JÚNIOR, V.; ANDRADE, L. N.; BEZERRA, L. N.; GURJÃO, L. M.; FARIAS, W. R. L. Reúso de água em um sistema integrado com peixes, sedimentação, ostras e macroalgas. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, v.9 (supl.), p.118-122, 2005.

CHUNG, H. J. & UITTO, J. Type VII Collagen: The Anchoring Fibril Protein at Fault in Dystrophic Epidermolysis Bullosa. **Dermatologic Clinics**, 28(1): 93-105, 2010.

DABOOR, S.M., BUDGE, S.M., GHALY, A.E., BROOKS, M.S. & DAVE, D.. Extraction and Purification of Collagenase Enzymes: A Critical Review. **American Journal of Biochemistry and Biotechnology**, 6: 239-263, 2010.

DAMODARAN S, PARKIN K, FENNEMA OR. **Química de alimentos de Fennema**. São Paulo: Artmed; 2010.

DEMAN JM. **Principles of food Chemistry**. Aspen: Maryland; 1999.

DRAGNES, B. T.; STORMO, S. K.; LARSEN, R.; ERNSTSEN, H. H.; ELVEVOLL, E. O. Utilisation of fish industry residuals: Screening the taurine concentration and angiotensin

converting enzyme inhibition potential in cod and salmon. **Journal of Food Composition and Analysis**, San Diego, v. 22, p. 714 – 717, 2009.

DUARTE, F. O. S. **Propriedades funcionais do colágeno e sua função no tecido muscular**. Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal da Escola de Veterinária e Zootecnia da Universidade Federal de Goiás. Goiânia, 2011.

FAO – Food and Agricultural Organization of the United Nations. **The state of world fisheries and aquaculture 2006 (SOFIA)**. Rome: FAO, 2007. 180p.

FAO. **Food and Agriculture Organization of the United Nations**. Fisheries and Aquaculture Department: Global Statistical Collections. 2014.

FAUZI, M.B., LOKANATHAN, Y., AMINUDDIN, B.S., RUSZYMAH, B.H.I. & CHOWDHURY, R.S. Ovine tendon collagen: Extraction, characterisation and fabrication of thinfilms for tissue engineering applications. **Materials Science and Engineering C**, 68:163–171, 2016.

FELTES, M.M.C.; CORREIA, J.F.G.; BEIRÃO, L.H.; BLOCK, J.M.; NINOW, J.L.; SPILLER, V.R. Alternativas para agregação de valor aos resíduos da industrialização de peixe. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**. V.14, n.6, p.669-677, 2010.

GEBAUER, J.M., KOBBE, B., PAULSSON, M., WAGENER, R. Structure, evolution and expression of collagen XXVIII: **Lessons from the zebrafish**. **Matrix Biology**, 49: 106–119, 2015.

GELSE, K., PÖSCHL, E. & AIGNER, T. Collagens–structure, function, and biosynthesis. **Advanced Drug Delivery Reviews**, 55:1531-1546, 2003.

GÓMEZ-GUILLÉN, M. C.; TURNAY, J.; FERNÁNDEZ-DÍAZ, M. D.; ULMO, N.; LIZARBE, M. A.; MONTERO, P. Structural and physical properties of gelatin extracted from different marine species: a comparative study. **Food Hydrocolloids**, v. 16, p. 25-34, 2002.

KOŁODZIEJSKA, I., SIKORSKI, Z. E., & NIECIKOWSKA, C.. Parameters affecting the isolation of collagen from squid (*Illex argentinus*) skin. **Food Chemistry**, 66, 153–157, 1999.

IBGE – **INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA**. Pesquisa pecuária municipal. Rio de Janeiro: IBGE, 2018.

JORGE, S. **Desenvolvimento de macarrão a base de pescado lavado, desodorizado (surimi) destinado à alimentação institucional e avaliação da sua qualidade protéica**. Florianópolis: UFSC, 1997. 94p. Dissertação Mestrado.

JUNQUEIRA, L.C. & CARNEIRO, J. **Histologia básica**. Rio de Janeiro, Brasil, 2013.

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.

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

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.

KOWALCZYK, D. Biopolymer/candelilla wax emulsion films as carriers of ascorbic acid – A comparative study. **Revista Food Hydrocolloids**, Lublin, v. 52, p. 543–553 ,2016.

KRISHNAMOORTHY, J., RAMASAMY, P., SHANMUGAM, V. & SHANMUGAM, A. Isolation and partial characterization of collagen from outer skin of *Sepia pharaonis* (Ehrenberg, 1831) from Puducherry coast. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, 10: 39-45, 2017.

KUBITZA, F. A evolução da tilapicultura no Brasil: produção e mercado. **Panorama da Aquicultura**, Rio de Janeiro, v. 13, n. 76, mar./abr. 2003.

LEE, C. F. Processing fish meal and oil. In: Stansby, E. M. Industrial fishery technology, **New York: Reinhold Publishing Corporation**, 1963. cap. 16, p.219-235.

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**, 31:103-113, 2013.

YNCH, E. et al. Molecular mechanisms of the bleaching actions associated with commercially-available whitening oral health care products. **J. Ir. Dent. Assoc.** v. 41, n. 4, p. 94-102, 1995.

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.

MARTINS, W.; S. **Inquérito exploratório referente à geração, armazenamento, transporte e descarte de resíduos em indústrias de pesca do Brasil**. Dissertação (Mestrado Ciência e Tecnologia de Alimentos). Universidade de São Paulo. Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”. Piracicaba, 2011.

MASILAMANI, D., MADHAN, B., SHANMUGAM, G., PALANIVEL, S. & NARAYAN, B. . Extraction of collagen from raw trimming wastes of tannery: a waste to wealth approach. **Journal of Cleaner Production**, 113: 338-344, 2016.

MIRANDA, F. F.; PORTO, M. R. A.; PACHECO, R. S.; HERNÁNDEZ-PRENTICE, C. **Processo tecnológico destinado à obtenção de flocos de corvina (*Micropogon furnieri*)**. In: Congresso de Iniciação Científica, 12, 2003, Pelotas. Resumos... Pelotas: UFPel, 2003.

MONTEIRO, M. L.G. Aproveitamento de resíduos da tilápia (*Oreochromis niloticus*) para elaboração de novos produtos com valor agregado. Tese (Doutorado em Higiene Veterinária e Processamento Tecnológico de Produtos de Origem Animal da Universidade Federal Fluminense), 177f., 2013.

MPA. **Ministério da Pesca e Aquicultura. Artigo: Cenário da Pesca no Brasil.** 2015.

NAGAI, T., TANOUE, Y., KAI, N., SUZUKI, N. Characterization of collagen from emu (*Dromaius novaehollandiae*) skins. **Journal of Food Science and Technology**, 1-8, 2014.

NELSON, D.L. AND COX, M.M., **Lehninger. Principles of Biochemistry**. 4 ed. New York: W. H. Freeman. 1119 p, 2005.

NEVES, R. A. M.; MIRA, N. V. M. DE; MARQUEZ, U. M. L. Caracterização de hidrolisados enzimáticos de pescado. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, v.24, n.1, p.101-108. 2004  
Ockerman HW, Hansen CL. **Industrialización de subproductos de origen animal**. Zaragoza: Acribia; 1994.

PERKINS, W. S. Advances made in bleaching practice. **Alexander Technique International**, 4, 92–94, 1996.

PHATCHARAT, S., BENJAKUL, S., & VISESSANGUAN, W. Effects of washing with oxidizing agents on the gel-forming ability and physicochemical properties of surimi produced from bigeye snapper (*Priacanthus tayenus*). **Food Chemistry**, 98, 431–439, 2006.

OLIVEIRA, S. H. S.; SOARES, M. J. G. O.; ROCHA, P. S. Uso de cobertura com colágeno e *aloe vera* no tratamento de feridas isquêmica: estudo de caso. **Rev Esc Enferm USP**. Vol. 44, no. 2, 2010.

OLIVEIRA, A. C. F.; FERRETO, H. F. R.; PARRA, D. F.; LUGÃO, A. B. Estudo comparativo de dois métodos de análise de cristalinidade, raios-x e dsc, usando o polietileno linear de baixa densidade (pebdl) injetado, irradiados por radiação gama. **Anais do 13º Congresso Brasileiro de Polímeros, Natal, 2015**.

OLIVO R, SHIMOKOMAKI M. Carnes: no caminho da pesquisa. **Cocal do Sul: Imprint**; 2001.

OLSEN, B.R. New insights into the function of collagens from genetic analysis. **Current Opinion in Cell Biology**, 7:720-727, 1995.

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.

SCHRIEBER, R.; GAREIS, H. Gelatine Handbook: Theory and Industry Practice. **Hardcover**, 371p. 2007.

SEIBEL, N. F.; SOARES, L. A. DE S. Produção de silagem química com resíduos de pescado marinho. **Brazilian Journal of Food Technology**, v.6, n.2, p.333-337, 2003.

SENARATNE, L.; S.; PARK, P.; J.; KIM, S.; K. Isolation and characterization of collagen from brownbacked toadfish (*Lagocephalus gloven*) skin. **Bioresource technology**, v. 97, p. 191-197, 2006.

SONG, E.; YEON KIM, S.; CHUN, T.; BYUN, H. J.; LEE, Y. M. Collagen seaffoods derived from a marine source and their biocompatibilly. **Biomateriais**, v. 27, p. 2951-2961, 2006.

THANONKAEW, A., BENJAKUL, S., VISESSANGUAN, W., & DECKER, E. A. The effect of antioxidants on the quality changes of cuttlefish (*Sepia pharaonis*) muscle during frozen storage. **LWT-Food Science and Technology**, 41, 161–169, 2008.

TERUEL, S.R.L.T. **Purification and characterization of collagenases from the skeletal muscle of winter flounder** (*Pseudopleuronectes americanus*). [Tese]. McGill University Montreal, Quebec. 1997.

TORLEY PJ, D'ARCY BR, TROUT GR. The effect of ionic strength, polyphosphates type, pH, cooking temperature and preblending on the functional properties of normal and pale, soft, exudative (PSE) pork. **Meat Science** 2000; 55:451-62.

UITTO, J., CHU, M.L., GALLO, R. & EISEN, A.Z. Collagen, elastic fibers, and extracellular matrix of the dermis, In: Wolff K, Goldsmith LA, Katz SI, Gilchrist BA, Paller AS, Leffell DJ (Ed). **Fitzpatrick's dermatology in general medicine**. 7th ed. New York: McGraw-Hill, 2008,

VEERURAJ, A.; ARUMUGAM, M.; AJITHKUMAR,T.; BALASUBRAMANIAN, T. Isolation and characterization of collagen from the outer skin of squid (*Doryteuthis singhalensis*). **Food Hydrocoll, Lucknow**, v. 43, p. 708-716, 2015.

VIDOTTI, R. M.; GONÇALVES, G. S. Produção e caracterização de silagem, farinha e óleo de tilápia e sua utilização na alimentação animal. **Instituto de Pesca**, São José do Rio Preto, 2006.

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**, 148:410-414, 2014.

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

ZEUGOLIS, D.I. & RAGHUNATH, M. Collagen: Materials Analysis and Implant Uses. In: P. Ducheyne, K. Healy, D. Hutmacher, D. Grainger, C. Kirkpatrick (Eds.). **Comprehensive Biomaterials** (pp. 261- 278). **Ed. Elsevier**, 2011.