

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

Daniela Pedrolo Weber Toniasso

**PROPRIEDADES FÍSICO-QUÍMICAS, ESTRUTURAIS E TECNOLÓGICAS DE
EXTRATOS COLAGÊNICOS DE DIFERENTES PARTES DO COELHO**

Santa Maria, RS
2020

Daniela Pedrolo Weber Toniasso

**PROPRIEDADES FÍSICO-QUÍMICAS, ESTRUTURAIS E TECNOLÓGICAS DE
EXTRATOS COLAGÊNICOS DE DIFERENTES PARTES DO COELHO**

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 obtenção do título de **Mestre em Ciência e Tecnologia dos Alimentos**.

Orientador: Prof Dr^o. Renius de Oliveira Mello

Co-orientadora: Prof Dr^a Rosa Cristina Prestes Dorneles

Santa Maria, RS
2020

TONIASSO, Daniela Pedrolo Weber
PROPRIEDADES FÍSICO-QUÍMICAS, ESTRUTURAIS E
TECNOLÓGICAS DE EXTRATOS COLAGÊNICOS DE DIFERENTES PARTES
DO COELHO / Daniela Pedrolo Weber Toniasso.- 2020.
70 p.; 30 cm

Orientador: Renius de Oliveira Mello
Coorientadora: Rosa Cristina Prestes Dornelles
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa
Maria, Centro de Ciências Rurais, Programa de Pós
Graduação em Ciência e Tecnologia dos Alimentos, RS, 2020

1. FTIR 2. Pepsina 3. Colágeno 4. Coelho 5.
Eletroforese I. Mello, Renius de Oliveira II.
Dornelles, Rosa Cristina Prestes III. Título.

Sistema de geração automática de ficha catalográfica da UFSM. Dados fornecidos pelo autor(a). Sob supervisão da Direção da Divisão de Processos Técnicos da Biblioteca Central. Bibliotecária responsável Paula Schoenfeldt Patta CRB 10/1728.

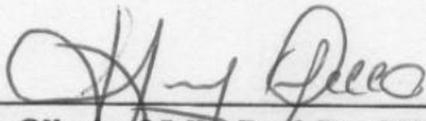
Declaro, DANIELA PEDROLO WEBER TONIASSO, para os devidos fins e sob as penas da lei, que a pesquisa constante neste trabalho de conclusão de curso (Dissertação) foi elaborada e que as informações necessárias objetivas de consulta em literatura e outras fontes estão devidamente referenciadas. Declaro, ainda, que este trabalho ou parte dele não foi apresentado anteriormente para obtenção de qualquer outro grau acadêmico, estando ciente de que a inveracidade da presente declaração poderá resultar na anulação da titulação pela Universidade, entre outras consequências legais.

Daniela Pedrolo Weber Toniasso

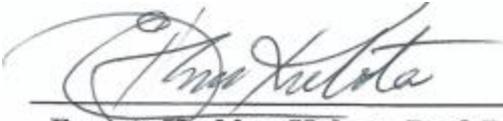
**PROPRIEDADES FÍSICO-QUÍMICAS, ESTRUTURAIS E TECNOLÓGICAS
DE EXTRATOS COLAGÊNICOS DE DIFERENTES PARTES DO COELHO**

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 obtenção do título de **Mestre em Ciência e Tecnologia dos Alimentos**.

Aprovado em 27 de março de 2020:



Renius de Oliveira Melló, Prof. Dr. (UFSM)
(Presidente/Orientador)



Ernesto Hashime Kubota, Prof. Dr. (UFSM)



Berilo de Souza Brum Junior, Prof. Dr. (IFFar)

Santa Maria, RS
2020

AGRADECIMENTOS

Primeiramente gostaria de agradecer à Deus pela sua presença em todos os momentos da minha vida e por essa oportunidade maravilhosa, sem ele não teria conseguido chegar até aqui.

À minha mãe, por todo apoio, amor, carinho, dedicação e por todo incentivo, te amo muito.

As minhas irmãs e melhores amigas, Andréia, Raquel e Gabriela, pelo carinho, pela cumplicidade, pelo incentivo e por estarem sempre ao meu lado mesmo morando tão longe. Amo vocês.

Ao meu esposo Marcelo, pelo companheirismo, amor, paciência, e acima de tudo, incentivo. Obrigada por nunca deixar eu desistir. Amo você.

Ao meu orientador Dr Renius de Oliveira Mello, pela orientação, confiança e apoio. Obrigada por compartilhar seus conhecimentos e por toda ajuda durante esses 2 anos. Muito obrigada!

Ao professor Dr. Ernesto Kubota pela paciência e humildade de compartilhar seus conhecimentos para realização da análise de eletroforese. Obrigada!

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

Aos professores e funcionários do DTCA pela dedicação, ajuda e pelos ensinamentos transmitidos.

À CAPES, pela bolsa de mestrado concedida.

À Universidade Federal de Santa Maria, pela formação proporcionada.

A todos que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho. Muito obrigada!

RESUMO

PROPRIEDADES FÍSICO-QUÍMICAS, ESTRUTURAIS E TECNOLÓGICAS DE EXTRATOS COLAGÊNICOS DE DIFERENTES PARTES DO COELHO

AUTORA: Daniela Pedrolo Weber Toniasso
ORIENTADOR: Renius de Oliveira Mello
CO-ORIENTADORA: Rosa Cristina Prestes Dorneles

A cunicultura apesar de ser pouco difundida no Brasil tem ganhado bastante importância visto que a carne de coelho é saudável, possui menor quantidade de gordura, além da elevada prolificidade do animal em curto espaço de tempo e da possibilidade de aproveitamento dos seus subprodutos. Esses subprodutos muitas vezes não são aproveitados e são destinados incorretamente no ambiente. Sendo assim, a obtenção do colágeno é uma alternativa promissora para agregar valor aos mesmos. O colágeno pode ser obtido por hidrólise química ou enzimática, sendo que a mais vantajosa e com maior rendimento é a enzimática através do uso de enzimas proteolíticas como papaína e pepsina. Diante do exposto, este estudo teve como objetivo o isolamento e a caracterização do colágeno da carne, pele e orelha de coelho. Os colágenos extraídos com pepsina obtiveram um bom rendimento, a estrutura helicoidal tripla permaneceu intacta, a qual pode ser confirmada pelas análises de espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier (FTIR), e pela eletroforese (SDS-PAGE), onde os colágenos eram constituídos basicamente por colágeno tipo I. Quanto as propriedades tecnológicas, os colágenos exibiram alta solubilidade em pH ácido e baixa solubilidade em pH elevado (alcalino), o índice de atividade emulsificante foi maior do que o encontrado para gelatina de ossos bovinos. Além disso, a formação de espuma dos colágenos foi relativamente baixa quando comparada com dados da literatura porém, a sua estabilidade foi alta. Conclui-se que as matérias primas de coelho estudados podem ser uma fonte viável para extração de colágeno, sendo utilizado como fonte alternativa aos colágenos de bovinos e suínos, além disso, agregar valor à carne e aos subprodutos da cunicultura.

Palavras-chave: FTIR, pepsina, coelho, colágeno, eletroforese.

ABSTRACT

PHYSICAL-CHEMICAL, STRUCTURAL AND TECHNOLOGICAL PROPERTIES OF COLLAGENIC EXTRACTS FROM DIFFERENT PARTS OF THE RABBIT

AUTHOR: Daniela Pedrolo Weber Toniasso

ADVISOR: Renius de Oliveira Mello

CO- ADVISOR: Rosa Cristina Prestes Dorneles

Rabbit meat, although not widespread in Brazil, has gained considerable importance since rabbit meat is healthy, has less fat, in addition to the high prolificity of the animal in a short time and the possibility of using its by-products. These by-products are often not used and are sent incorrectly in the environment. Therefore, obtaining collagen is a promising alternative to add value to them. Collagen can be obtained by chemical or enzymatic hydrolysis, and the most advantageous and with the highest yield is enzymatic through the use of proteolytic enzymes such as papain and pepsin. In view of the above, this study aimed to isolate and characterize collagen in rabbit meat, skin and ear. Collagen extracted with pepsin obtained a good yield, the triple helical structure remained intact, which can be confirmed by the analysis of infrared spectroscopy with Fourier transform (FTIR), and by electrophoresis (SDS-PAGE), where the collagens were constituted basically by type I collagen. As for technological properties, collagens exhibited high solubility in acid pH and low solubility in high pH (alkaline), the emulsifying activity index was higher than that found for bovine bone gelatin. In addition, the collagen foaming was relatively low when compared to literature data, however, its stability was high. It is concluded that the studied rabbit raw materials can be a viable source for collagen extraction, being used as an alternative source to bovine and swine collagen, in addition to adding value to meat and by-products of rabbit farming

Keywords: FTIR, pepsin, rabbit, collagen, electrophoresis.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Espectro de FTIR dos extratos de colágeno de coelho.....	60
Figura 2: Eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) do colágeno dos extratos de colágeno de coelho.....	60
Figura 3: Curvas de solubilidade em função do pH (0 a 10) ajustadas dos extratos de colágeno de coelho.....	61

LISTA DE TABELAS

Quadro 1. Principais tipos de colágeno e distribuição.....	19
Quadro 2. Estudos que mencionaram a extração de colágenos disponíveis na literatura.....	22
Artigo I	
Tabela 1. Resultados obtidos para propriedade física e composição química das matérias-primas usadas para obter extratos de colágeno de coelho.....	58
Tabela 2. Resultados obtidos para rendimento, propriedade física e composição química dos extratos colagênicos de coelho.....	58
Tabela 3. Capacidade de formação de espuma (CFE) e estabilidade da espuma (EE) dos extratos colagênicos de coelho na concentração de 0,25%, 0,5% e 1%.....	59
Tabela 4. Propriedades tecnológicas (índice de atividade emulsionante (EAI), índice de estabilidade da emulsão (ESI) e digestibilidade <i>in vitro</i>) dos extratos colagênicos de coelho	59

LISTA DE ABREVIATURAS

ANOVA – Análise de Variância Univariada

AOAC – Association of Official Analytical Chemists

BSE – Espongiforme Bovina

CFE – Capacidade de Formação de Espuma

DSC – Calorimetria Exploratória Diferencial

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

pH – Potencial Hidrogeniônico

pI – Ponto isoeletrico

SDS-PAGE Eletroforese em Gel de Poliacrilamida

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	12
2 OBJETIVOS	14
2.1 OBJETIVO GERAL	14
2.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	14
3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	15
3.1 Produção mundial e no Brasil de carne de coelho	15
3.2 Subprodutos do processamento de coelho	16
3.3 Coelho	16
3.4 Colágeno	17
3.5 Obtenção do Colágeno	21
3.6 Aplicação do Colágeno	25
4 DESENVOLVIMENTO	26
4.1 ARTIGO I.....	26
5 CONSIDERAÇÕES FINAIS	61
6 SUGESTÕES DE TRABALHOS FUTUROS	62
7 CONCLUSÃO	62
8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	63

1.INTRODUÇÃO

A cunicultura é uma atividade estratégica devido a várias características, incluindo ser uma atividade sustentável, produzir uma grande quantidade de alimentos de alta qualidade nutricional em um curto espaço de tempo, além da elevada produtividade e possibilidade de aproveitamento dos seus subprodutos e também da possibilidade de comercialização dos mesmos com idade precoce (MACHADO, 2012).

Quando comparado a outras fontes de carnes como galinha, porco, cordeiro e carne bovina a de coelho possui menor quantidade de sódio, gordura e colesterol, em função dessas características a mesma tem ganhado cada vez mais importância entre os consumidores (FORRESTER-ANDERSON et al., 2006).

A produção de carnes de coelho no Brasil foi de 1.307 toneladas no ano de 2017, se comparado com o ano de 2010 que teve uma produção de 1575 toneladas, é possível observar que houve uma redução na produção de carne de coelhos no Brasil (FAOSTAT). No entanto, sabe-se que a maioria desses animais são abatidos sem a devida fiscalização e esses registros não chegam ao órgão de controle, mesmo assim, acredita-se na expansão da cunicultura brasileira, visto que para criação de coelhos é necessário pouco espaço, baixo investimento, aproveitamento de praticamente toda a carcaça, sendo estes os principais pontos positivos para implantação da atividade cunícula em pequenas propriedades (MACHADO & FERREIRA, 2011; XICCATO, 1999).

Muitos dos estudos disponíveis na literatura tem abordado a obtenção de colágeno de várias fontes de animais, sendo na maioria pescados (ARUMUGAM et al., 2018; BHUIMBAR et al., 2019; LIU et al., 2015; WANG et al., 2018; ZHANG et al., 2016). A busca por diferentes fontes de extração de colágeno é uma alternativa ao colágeno bovino em virtude de algumas doenças infecciosas dos mesmos como a Encefalopatia espongiiforme bovina (BSE) e a febre aftosa; além da substituição do colágeno suíno devido as questões religiosas nos países de religião muçulmana

No México, os produtores de coelho têm enfrentado uma problemática com o manejo de resíduos desse animal, como uma alternativa Martínez-Ortiz et al. (2015) utilizou a pele do coelho para extração de colágeno como uma forma de melhor utilização desse tipo resíduo. Sendo assim, os subprodutos oriundos da cunicultura, como pele, orelha e também o seu produto nobre como a carne são ricos em proteína, podendo ser

usados como fonte alternativa aos colágenos de bovinos, suínos, aves e peixe, agregando valor aos subprodutos e a carne, reduzindo assim a poluição ambiental.

O colágeno e seus derivados podem ser obtidos dos subprodutos de diferentes fontes de animais como por exemplo, de aves, peixes, coelhos, etc. Os mesmos podem ser obtidos por hidrólise química ou enzimática, sendo que a enzimática é mais promissora devidos ao uso de enzimas como pepsina, papaína, etc; que melhoram o rendimento final de colágeno e o seu valor nutritivo e funcional (MARTINS et al., 2009).

Existem poucos estudos disponíveis na literatura sobre a obtenção e caracterização de colágenos dos subprodutos e da carne provenientes do processamento de coelhos, sendo assim o estudo dos mesmos é muito importante podendo ser uma alternativa de extração de colágeno com ampla disponibilidade, visto que o animal possui elevada prolificidade, em curto espaço de tempo, bem como uma alternativa de agregação de valor e melhor utilização dos subprodutos provenientes da cunicultura. Alguns estudos encontrados foram direcionados à pele do coelho. Em função disso, este estudo teve como objetivo a caracterização e obtenção de colágenos da carne, pele e orelha de coelho.

2. OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Isolamento e caracterização do colágeno da carne, pele e orelha de coelho (*Oryctolagus cuniculus*) através de extração enzimática.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Caracterizar as diferentes matérias primas gerados no processamento de coelho (carne, pele e orelha).

Obter os colágenos por extração enzimática com pepsina;

Caracterizar os extratos de colágenos de coelho obtidos;

Avaliar as propriedades tecnológicas dos extratos de colágenos de coelho.

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Nesta revisão será apresentada a fundamentação teórica e a revisão bibliográfica sobre os subprodutos do processamento de coelho; sobre a produção mundial e brasileira de coelhos; os métodos de extração; obtenção do colágeno utilizando pepsina e alguns estudos disponíveis na literatura sobre colágeno extraído de diferentes fontes.

3.1 Produção mundial e no Brasil de carne de coelho

A produção de coelhos no Brasil apresenta-se em fase de desenvolvimento, conforme os dados da FAO (2011), o mesmo já produziu aproximadamente 1.575 toneladas de carne de coelho, ficando em 32^a lugar em relação a outros países produtores. No ano de 2017, segundo dados da FAO, esse valor diminuiu para 1307 toneladas. Um dos motivos para essa queda é o hábito cultural do brasileiro que não visualiza o coelho como um animal de produção e sim como animal de estimação (MACHADO, 2012).

Além disso, conforme dados da FAOSTAT (2014), o efetivo mundial de coelhos em 2002 foi de 714.597 cabeças, em 2012 o efetivo de coelhos foi de 877.199 cabeças abatidas. Já no ano de 2017, observou-se que esses valores cresceram cada vez mais, onde o efetivo de coelhos foi de 971.951 cabeças abatidas (FAO). Além disso, no ano de 2012, a produção mundial de carne de coelho foi de 1.295.871 toneladas e em 2017 a produção foi ainda maior, totalizando 1.482.441 toneladas de carne (FAOSTAT).

Os continentes Asiático e Europeu, são os países com o maior destaque no efetivo dos rebanhos de coelhos, onde apresentam 73,4%, e 19,6 % da produção mundial, respectivamente. O país com maior produção de coelhos é a China, com cerca de 542.271 mil cabeças, chegando a 849.150 toneladas de carne produzidas em 2016 (FAOSTAT, 2016). Em 2017 esses valores aumentaram, apresentando uma produção de 584.849 mil cabeças, e 931.834 toneladas de carne. A China, além de possuir a maior população de coelhos, também é considerada o maior produtor de carne de coelho (MACHADO, 2012).

Segundo Ferreira et al.(2012), a falta de pesquisas, de programas de melhoramento genético e incentivos governamentais são alguns fatores limitantes à produção de coelhos no Brasil.

3.2 Subprodutos do processamento de coelho

A grande produção de resíduos e subprodutos de origem animal, constitui-se num problema ambiental, principalmente, em sistemas de confinamentos. Estes quando depositados em locais inadequados podem resultar na contaminação dos solos e das águas (ECKHARDT, 2011; MORALES, 2011).

No Brasil, há uma escassa exploração dos subprodutos dos coelhos, segundo Machado & Ferreira (2014) a maioria dos cunicultores não tem espaço para estocar as peles dos animais, o grau de aproveitamento é muito abaixo do desejado, e para ocorrer uma exportação desses materiais, ainda há problemas de logística.

A possibilidade do aproveitamento de subprodutos do abate é uma alternativa para agregar valor, pois através da carcaça do coelho, pode-se aproveitar praticamente tudo. O sangue pode ser utilizado para produção de soro com grande aplicação na biotecnologia, do cérebro pode ser utilizado a tromboplastina, a qual é um importante produto para coagulação sanguínea, das patas podem ser obtidos adornos, da pele utiliza-se para a indústria de roupas e o couro é muito apreciado para produção de outros apetrechos da vestimenta como sapatos, carteiras e cintos (MACHADO; FERREIRA, 2011). Assim, além da carne, pele e pelos, é possível a comercialização de outras partes também, como o cérebro, orelhas, carcaça e o esterco (SILVA, 2017).

Devido a busca por uma produção mais sustentável, a valorização de subprodutos industriais tem sido um dos assuntos de grande interesse da atualidade (PRESTES, 2013). A crescente valorização de subprodutos industriais para produção de colágeno é uma das principais razões para efetuar a extração de diferentes espécies de animais (GÓMEZ-GUILLÉN et al., 2011). Os subprodutos do abate de coelho como orelha e pele possuem um alto teor de proteínas, tornando-o uma alternativa promissora para obtenção de colágeno, agregando valor aos subprodutos e a carne de coelho, dado que os colágenos possuem elevado valor comercial.

3.3 Coelho (*Oryctolagus cuniculus*)

O coelho é um mamífero da ordem dos Lagomorfos, pertencente à família Leporidae, de origem europeia, de onde derivam as diversas raças e híbridos comerciais existentes, e pertencentes ao gênero *Oryctolagus* e à espécie *cuniculus*, caracteriza-se por possuir dois pares de incisivos no maxilar (têm apenas um par de incisivos na mandíbula),

característica comum a todos os lagomorfos e que os difere em termos de dentição dos roedores (LOPES, 2017).

O coelho é um animal, que apresenta algumas vantagens biológicas interessantes, como adaptação ao consumo de alimentos fibrosos por ser herbívoro, possui também um ciclo de vida curto e muito prolífero. Ele é considerado um ótimo produtor de carne saudável com baixo teor de gordura e colesterol, este possui um elevado teor de proteína de alta digestibilidade, apresentando um bom rendimento de carcaça (cerca de 60% com a cabeça), além de ser um fornecedor de pele muito procurada e apreciada no mercado internacional (FERREIRA et al., 2012).

Além disso, em comparação com outras espécies de carnes, a carne de coelho é rica em aminoácidos essenciais para o nosso organismo como lisina (2,12g/100g), treonina (2,01g/ 100g), valina (1,19g/ 100g), isoleucina (1,15g/ 100g) e fenilalanina (1,04g/ 100g), em função disso a quantidade de aminoácidos essenciais combinado com a fácil digestibilidade conferem um maior valor biológico a proteína da carne de coelho. (DALLE ZOTTE, 2004; DALLE ZOTTE, 2014). A carne de coelho também possui um baixo teor de sódio, o que torna uma excelente opção de consumo na dieta de pessoas que sofrem de hipertensão, além disso, possui excelente relação $\omega 3/\omega 6$ representando uma ótima opção para pessoas que buscam uma dieta saudável com baixo conteúdo calórico (DALLE ZOTTE, 2002; DALLE ZOTTE, 2014).

A cunicultura voltada para produção de carne ainda é pouco difundida no Brasil devido aos hábitos culturais dos brasileiros, os quais são resistentes ao consumo de carnes diferentes. Além disso, a pouca oferta de carne de coelho no mercado eleva o custo de produção e a restrição do mercado (FERREIRA et al., 2012). Já a cunicultura Pet, ou seja, para serem animais de companhia e estimação tem crescido cada vez mais (MACHADO, 2012).

3.4 Colágeno

O colágeno é a proteína dominante no tecido conjuntivo podendo ser encontrado sob várias formas em tecidos de todas as espécies de organismos multicelulares, exercendo diversas funções (DAMODARAN et al., 2010; SHIMOKOMAKI et al., 2006). O mesma pode ser encontrada principalmente ao longo do corpo como nos ossos, cartilagem, tendões, pele, veia, dentes e músculos, sendo um ingrediente funcional importante para a produção de gelatina e colágeno (DAMODARAN et al., 2010). É um

produto de alto valor e tem sido fonte de investigação para uso industrial devido à sua abundância no tecido de animais como bovinos, suínos, caprinos, ovinos, peixes, anfíbios, entre outros (FAUZI et al., 2016; KRISHNAMOORTHY et al., 2017; MASILAMANI et al., 2016).

O colágeno pode ser classificado como estriado (fibroso), não fibroso (formador de rede), microfibrilar (filamentoso) e associado às fibrilas. A unidade básica do colágeno é o tropocolágeno que é formado por três cadeias de polipeptídeos que se entrelaçam em formato helicoidal formando uma molécula linear com 180 nm de comprimento, 1,4 a 1,5 µm de largura e massa molecular de 360.000 Da (DEMAN, 1999). As moléculas de tropocolágeno são estabilizadas pelas interações hidrofóbicas e eletrostáticas (DAMODARAN et al., 2010).

Frequentemente, o colágeno é constituído basicamente de 33% de glicina, 12% de prolina, 11% de alanina, 10% de hidroxiprolina, 1% de hidroxilisina e pequenas quantidades de aminoácidos polares carregados positivamente e negativamente (ROSS; PAWLINA, 2010). De modo geral, uma unidade tripeptídica, glicina-X-prolina ou glicina-X-hidroxiprolina, forma a sequência de aminoácidos no colágeno, onde X pode ser um dos 20 aminoácidos-padrão (SILVA; PENNA, 2012).

Atualmente, já foram identificados um total de vinte e nove variantes de colágeno (WANG et al., 2014). Estudos mostram que as propriedades funcionais do colágeno, tais como suas propriedades gelificantes e formadoras de filme, superfície de comportamento e microencapsulação, se diferem nos diferentes tipos de colágeno existentes (GÓMEZ-GUILLÉN et al., 2011).

O colágeno tipo I que também é chamado de colágeno nativo ou tropocolágeno é o mais abundante e está presente na pele, tendões, ligamentos e ossos. Sua composição de fibras espessas confere rigidez, elasticidade e boa resistência mecânica aos tecidos (OLIVO; SHIMOKOMAKI, 2002; RICARD-BLUM, 2011).

Já as fibrilas de colágeno tipo II correspondem a 80% do conteúdo de colágeno total e estão de forma predominante e característica na cartilagem hialina. Além dessas, os colágenos tipos IX e XI também estão presentes nas cartilagens (GELSE et al., 2003; MENDELER et al., 1989;).

Enquanto o colágeno do Tipo III, tem uma relação direta com a idade: sendo que uma pele muito jovem pode conter até 50% do mesmo, no entanto, com o passar do tempo, pode ser reduzido para 5 a 10%. Os outros tipos de colágeno estão presentes apenas em quantidades bem reduzidas, principalmente em órgãos específicos, como

lâminas basais, córnea, músculo do coração, pulmão e mucosa intestinal (KARIM; BHAT, 2009; SCHRIEBER; GAREIS, 2007).

Os colágenos tipo V e XI existem em vários tecidos, o colágeno tipo V forma, de modo geral, heterofibrilas e o colágeno tipo XI participa da cartilagem articular de humanos. O colágeno tipo VI possui fibrilas com filamentos finos e pertence ao grupo de colágeno microfibrilar contribuindo para integridade da epiderme (BIRK, 1988; FESSLER et al., 1986; GELSE et al., 2003; RICARD-BLUM, 2011).

O colágeno tipo IX representa 1% do total de colágeno da cartilagem articular e está presente em todas as cartilagens hialinas, bem como o colágeno tipo XVI. Identificado em cartilagem articular de suínos e em esterno de aves, o colágeno tipo IX foi denominado de tipo M, sendo considerado responsável por contribuir com a formação do colágeno tipo II da cartilagem e do corpo vítreo (GELSE et al., 2003; SHIMOKOMAKI et al., 1981).

Recentemente tem crescido o interesse pelo processo de extração do colágeno e seus derivados devido à tendência de utilização dessa proteína em substituição aos agentes sintéticos nos mais diversos processos industriais e também pela possibilidade da valorização dos subprodutos provenientes do abate de animais (GÓMEZ-GUILLÉN et al., 2011; KARIM; BHAT, 2008; PRESTES, 2013).

No quadro 1 é podemos observar os tipos e a distribuição tecidual do colágeno no organismo de mamíferos

Quadro 1 – Tipos de colágenos e sua distribuição

Tipos de colágeno	Distribuição	Referências
I	Músculos, pele, tendões, ligamentos, ossos, tecidos conjuntivos	LOSSO; OGAWA, 2014; OLIVO; SHIMOKOMAKI, 2002; RICARD-BLUM, 2011; VON DER MARK, 1981; BIRK, 1988; JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2008.
II	Cartilagens (hialina, elástica e fibrosa), corpo vítreo e núcleo pulposo	MENDELER et al., 1989; GELSE et al., 2003; LOSSO; OGAWA, 2014, VON DER MARK, 1981; JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2008
III	Pele, músculos; fibras do interstício, da derme, veias, fígado, baço, tecido dos pulmões e vasos sanguíneos	LOSSO; OGAWA, 2014; VON DER MARK, 1981; GELSE et al., 2003; JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2008.
IV	Músculos; membranas basais	LOSSO; OGAWA, 2014; VON DER MARK, 1981; GELSE et al., 2003; JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2008.
V	Tecidos conjuntivos, peles, tecidos fetais, córnea, cartilagens e ossos;	BIRK, 1988; GELSE et al., 2003; RICARD-BLUM, 2011; CHUNG; UITTO, 2010
VI	Epiderme, cartilagem, placenta, pulmões	BIRK, 1988; FESSLER et al., 1986; GELSE et al., 2003; RICARD-BLUM, 2011
IX	Cartilagens hialinas e córnea	MENDELER et al., 1989; GELSE et al., 2003; RICARD-BLUM, 2011
XI	Tecidos conjuntivos, peles, cartilagens e ossos, cartilagem articular	LOSSO; OGAWA, 2014; GELSE et al., 2003; FESSLER et al., 1986; RICARD-BLUM, 2011.
XVI	Cartilagens hialinas	SHIMOKOMAKI et al., 1981; GELSE et al., 2003.

Fonte: Daniela Pedrolo Weber Toniasso.

3.5 Obtenção de colágeno

O colágeno pode ser isolado através de diferentes métodos de extração como utilizando um sal neutro ou alcalino, ácido acético, ácido propiônico ou meio enzimático. O método de extração mais utilizado é o ácido e o enzimático (KRISHNAMOORTHY et al., 2017; MASILAMANI et al., 2016; ZEUGOLIS; RAGHUNATH, 2011) ou uma combinação desses dois para aumentar a eficácia da extração obtendo-se um maior rendimento final na extração do colágeno (FAUZI et al., 2016; MURALIDHARAN et al., 2013). A extração ácida e a alcalina são mais trabalhosas, requerendo temperaturas mais elevadas (chegando até 75 °C), além de períodos mais longos; enquanto que a ácida e enzimática é caracterizada por um período de até 192 horas para obtenção do colágeno e diversos reagentes químicos como: NaOH, ácido acético, pepsina e NaCl (HUANG et al., 2016).

Primeiramente, antes da extração é realizado um pré-tratamento da amostra com o objetivo de remover a gordura, proteínas não colagenosas, cálcio e o máximo de impurezas sem que haja a desnaturação proteica. A purificação pode ser realizada através de precipitação salina, diálise e métodos cromatográficos (ZEUGOLIS; RAGHUNATH, 2011).

Liang et al. (2014) isolaram e caracterizaram o colágeno da cartilagem do esturjão Amur (*Acipenser schrenckii*) através de uma extração em solução salina, ácido acético e posteriormente extração com pepsina, os rendimentos obtidos foram de 2,18%, 27,04% e 55,92%, respectivamente. Todos os colágenos isolados mantiveram a estrutura de tripla hélice e eram compostos principalmente por colágeno tipo I e II. A análise de FTIR indicou mais ligações de hidrogênio no colágeno solúvel em ácido e no colágeno solúvel em pepsina mais ligações cruzadas intermoleculares. 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.

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

Singh et al. (2011) extraíram colágeno solúvel em meio ácido (ASC) e em pepsina (PSC) da pele de bagre listrado (*Pangasianodon hypophthalmus*), e o rendimento do colágeno foi de 5,1% e 7,7%, respectivamente. Tanto ASC como PSC foram

caracterizados como colágeno do tipo I, a análise de FTIR para ambos foi quase semelhantes e a hidrólise de pepsina não teve efeito marcado na estrutura tripla-helicoidal do colágeno. Além disso, os mesmos apresentaram maior solubilidade em pH ácido.

Muralidharan et al (2013) extraíram colágeno solúvel em ácido e em pepsina, a partir de ossos, pele e músculos do peixe jaqueta de couro. Os melhores rendimentos foram para extração com pepsina. O músculo apresentou um rendimento de 21% quando extraído só com ácido e aumentou para 28% quando foi extraído com a pepsina.

No Quadro 2, 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 2: Alguns estudos que mencionaram a extração de colágenos disponíveis na literatura

MATÉRIA – PRIMA	PRÉ-TRAMENTO	EXTRAÇÃO	CARACTERIZAÇÃO	REFERÊNCIA
Pele de Coelho	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.	Extrações consecutivas com ácido acético 0,5 M por 48 h, NaCl 2,6 M em ácido acético 0,5 M e pepsina a uma concentração de 1 g/L durante 24 h	Reômetro; Calorimetria exploratória diferencial (DSC); Eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE); Perfil de aminoácidos;	MARTÍNEZ-ORTIZ et al., 2015
Manto de Lula <i>L. Vulgaris</i>	Remoção das proteínas não colagenosas com NaOH 0,1M por 2 dias	ASC-Extração com solução de ácido acético 0,5 M por 3 dias sob agitação contínua. PSC-extração com ácido acético 0,5 M com pepsina a 0,1% (p / v) por 3 dias a 4 ° C sob agitação contínua.	Eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) Perfil de aminoácidos Calorimetria exploratória diferencial (DSC) FTIR Solubilidade	COZZA et al, 2016
Pele de loach <i>(Misgurnus anguillicaudatu)</i>	Remoção das proteínas não colagenosas com NaOH 0,1 M, 1:20 (p/v), durante 24 h. Lavagem com água fria até pH neutro.	ASC-extração com ácido acético 0,5 mol / L na proporção de 1:20 (p/v) por 24h a 4 ° C. PSC- extração com 20 vol. de ácido acético a 0,5 mol /L contendo 5% (p /v) de pepsina por 24 h a 4 ° C.	Eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) FTIR Perfil de aminoácidos Dicroísmo circular (CD) Potencial Zeta	WANG et al, 2018

Ossos, peles e tendões de pés de pato	Lavagem com 10 volumes (v/m) de etanol a 20% por 24 h para descartar gordura e pigmentos. Tratamento com 10 volumes de NaOH 0,2 N por 24 h para remover substâncias não colagenosas	Extração com 10 volumes de ácido acético 0,5 M contendo pepsina a 5% (m/m) por 24h	Eletroforese em gel (SDS-PAGE) Espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier (FTIR) Calorimetria exploratória diferencial (DSC)	KIM et al, 2016
Ossos de Ovinos	Remoção das proteínas não colagenosas com NaOH 0,1 M, 1:10 (p/v), durante 48 h. Desengorduramento com 10 volumes de álcool butílico 10% por 72h. Lavagem com água destilada e em seguida foi realizada a descalcificação com 10 volumes de solução de 0,5 mol L ⁻¹ de EDTA-2Na (pH = 7,5) por 5 dias.	ASC-extração com ácido acético 0,5 mol / L na proporção de 1:10 (p/v) por 3 dias. PSC- extração com ácido acético 0,5 mol L ⁻¹ contendo pepsina suína (Amresco, EUA) (20 U g ⁻¹ ossos) com uma relação sólido/solvente de 1:10 (p/v) a 4 ° C por 3 dias com agitação.	Eletroforese em gel (SDS-PAGE) Espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier (FTIR) Perfil de aminoácidos Calorimetria exploratória diferencial (DSC) Potencial zeta	GAO et al, 2018

Fonte: Daniela Pedrolo Weber Toniasso.

3.6 Aplicação do colágeno

O colágeno possui diversas aplicações na indústria farmacêutica, cosmética, e fotográfica e na área de alimentos, ultimamente, têm aumentado as aplicações de colágeno como agente espumante, agente emulsificante, agente de liga, estabilizante, encapsulamento de micro-organismos e capacidade de formação de filmes e biofilmes (DENIS et al., 2008; GÓMEZ-GUILLÉN et al., 2011; KIM; MENDIS, 2006).

A utilização de colágeno vem de encontro com a tendência de consumo de alimentos com maior apelo nutricional e com a substituição parcial ou total de gordura e carboidratos por ingredientes funcionais (MICHELINI et al., 2007).

O colágeno tem sido bastante explorado para usos na indústria de alimentos devido seu grande potencial de aplicação, o mesmo possui diversas propriedades como: extensor, umidificante, emulsificante e melhorador de textura e valor nutritivo dos alimentos. Na indústria de carnes, as diversas funcionalidades do colágeno poderiam ser melhores aproveitadas em produtos reestruturados e emulsionados, conferindo um melhor desempenho tecnológico e econômico (OLIVO; SHIMOKOMAKI, 2002).

Na indústria de processamento alimentício, o colágeno e/ou seus fragmentos peptídicos também podem ser utilizados na preparação de alimentos e bebidas, com a finalidade de melhorar a elasticidade, consistência e estabilidade dos produtos, aumentando a qualidade e valor nutricional dos produtos (HASHIM et al., 2015).

4. DESENVOLVIMENTO

4.1 ARTIGO 1

EXTRAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DO COLÁGENO DA CARNE, PELE E ORELHA DE COELHO

**Artigo em fase final de revisão para ser submetido à Revista International Food
Chemistry**

(Formatado conforme as normas da revista)

COLÁGENO DE COELHO

Extração e caracterização do colágeno da carne, pele e orelha de coelho

Daniela Pedrolo Weber Toniasso^{1*}, Camila Giacomelli ¹, Ernesto H. Kubota¹, Rosa C. P. Dornelles ¹, Berilo de Souza Brum Junior², Renius O. Mello¹

Scientific section: Processing and Products

¹ Federal University of Santa Maria, Department of Food Science and Technology,

² Federal Institute of Education Science and Technology Farroupilha Campus Júlio de Castilhos(IFFAR), RS-527, s/n, 98130-000, Distrito de São João do Barro Preto, Júlio de Castilhos - RS, Brazil

Avenida Roraima, 1000, 97105-900, Camobi, Santa Maria RS, Brazil.

*Corresponding author: Daniela Pedrolo Weber Toniasso. Address: Palma, 8º Distrito, RSC 287, Santa Maria, Rio Grande do Sul, Brazil, Tel: +55 55 9 96725052.

E-mail: danielapedroloweber@gmail.com

Resumo: A carne, pele e orelha de coelho foram usadas para obtenção dos colágenos, agregando valor aos mesmos. O objetivo deste estudo foi a obtenção e caracterização do colágeno da carne, pele e orelha de coelho. Os extratos de colágenos da carne, pele e orelha apresentaram um rendimento de 9,05%, 24,4% e 23,8% em base seca. A análise de SDS-PAGE demonstrou que os colágenos são constituídos principalmente de colágeno tipo I, e os espectros de FTIR demonstraram picos característicos de amida A, B, I, II e III, além disso os colágenos demonstraram maior solubilidade em pH ácido. A capacidade de formação de espuma dos colágenos foi baixa quando comparadas com alguns dados da literatura, mas a estabilidade da espuma foi alta. O índice de atividade emulsificante para carne, pele e orelha foi de 44,7 m²/g, 46,6 m²/g e 48,2m²/g, respectivamente, esses resultados foram superiores ao encontrado para gelatina de osso bovino. Assim, conforme os resultados, a carne, pele e orelha de coelho mostraram ser uma fonte viável para extração de colágeno, sendo uma alternativa ao colágeno bovino e suíno, agregando valor a essas matérias primas.

Palavras-chave: Pepsina; FTIR; Eletroforese; coelho; rendimento.

1.Introdução

O aumento da produção de produtos processados a base de carne tem gerado um aumento significativo na geração de subprodutos, como vísceras, cabeças, pés, e pele, por exemplo, no qual são na maioria utilizados na produção de ração animal. Entretanto, os mesmos contém quantidades significativas de proteínas, como o colágeno, que podem ser utilizados na indústria alimentícia agregando valor a esses subprodutos (Araújo et al., 2018).

O colágeno é a proteína dominante no tecido conjuntivo podendo ser encontrado sob várias formas, em tecidos de todas as espécies de organismos multicelulares, exercendo diversas funções, e isso representa cerca de 30% do total de proteínas no corpo animal (Shimokomaki, Olivo, Terra & Franco, 2006; Damodaran, Parkin & Fennema, 2010; Birk & Bruckner, 2005), ele pode ser encontrado ao longo do corpo como ossos, cartilagem, tendões, pele, veia, dentes e músculos, sendo um ingrediente funcional importante para a produção de colágeno e gelatina (Damodaran, Parkin & Fennema, 2010).

Atualmente, na literatura já foram identificados 29 variantes de colágeno sendo que cada uma difere consideravelmente na sequência, estrutura e função dos aminoácidos, mais provavelmente associadas a variantes genéticas específicas (Liu, Liang, Regenstein & Zhou, 2012). Dentre eles, o colágeno do tipo I é o mais abundante e compreende cerca de 90% do colágeno do corpo humano, sendo encontrado principalmente na pele, tendão, osso, ligamento e córnea (Willard, Drexler & Das, 2013; Xiong, Ghosh & Hiller, 2009).

O colágeno tem sido amplamente utilizado nas indústrias de alimentos, para materiais biomédicos, produtos farmacêuticos e cosméticos (Sinthusamran, Benjakul, Kishimura & Zhou, 2013). As principais fontes de colágeno são provenientes de peles e ossos de bovinos e suínos, no entanto, o risco do surto de algumas doenças como a encefalopatia espongiforme bovina (BSE), encefalopatia espongiforme transmissível (EET) e a febre aftosa, assim como restrições religiosas dos suínos (Jeevithan, Wu, Nanping, Lan & Bao, 2014), levaram os pesquisadores e usuários de colágeno encontrarem diferentes fontes de extração (Jongjareonrak, Benjakul, Vesessanguan, Nagai & Tanaka, 2005; Nagai, Tanoue, Kai & Suzuki, 2014; Kaewdang, Benjakul, Kaewmanee & Kishimura, 2014; Kittiphattanabawon, Benjakul, Visessanguan, Kishimura & Shahidi, 2010). Sendo assim, muitos estudos estão sendo conduzidos para

caracterizar o colágeno provenientes de diferentes fontes e avaliar sua funcionalidade com diferentes métodos de extração (Lin & Liu, 2006a, Lin & Liu, 2006b; Wang et al., 2014). Muitos subprodutos já foram estudados, entre eles estão, pés de galinha (Cheng, Hsu, Chang, Lin & Sakata, 2009), pericárdio bovino (Santos et al., 2013), pele de peixe-gato do canal (*Ictalurus punctatus*) (Tan & Chang, 2017), pele de pêra (*Misgurnus anguillicaudatus*) (Wang, Pei, Liu & Zhou, 2018), pele de peixes chatos (*Paralichthys olivaceus*) (Song, Jung, Kim, Kim & Lee, 2018), pele de peixes (*Brama australis*) (Sionkowska, Kozłowska, Skorupska & Michalska, 2015), ossos, peles e tendões em pés de pato (Kim et al., 2016), pele de tubarão bambu de faixa marrom (*Chiloscyllium punctatum*) (Kittiphattanabawon, Benjakul, Visessanguan, Kishimura & Shahidi, 2010). Com base nos dados da literatura, existem poucos estudos sobre os subprodutos oriundos da cunicultura como pele e orelha e também da carne de coelho para obtenção de colágeno.

Assim, o objetivo desse estudo foi isolar e caracterizar o colágeno solúvel em pepsina da carne, pele, orelha.

2. Material e métodos

As matérias-primas como orelha, pele e carne foram obtidas através de uma parceria com o Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia de Farroupilha - Campus Júlio de Castilhos. Os coelhos usados nesse experimento eram da raça Nova Zelândia Branco e foram abatidos com 90 dias de idade. A matéria-prima foi armazenada sob congelamento em freezer (Metalfrio, VF50F) a -22 °C.

2.1 Caracterização da matéria-prima

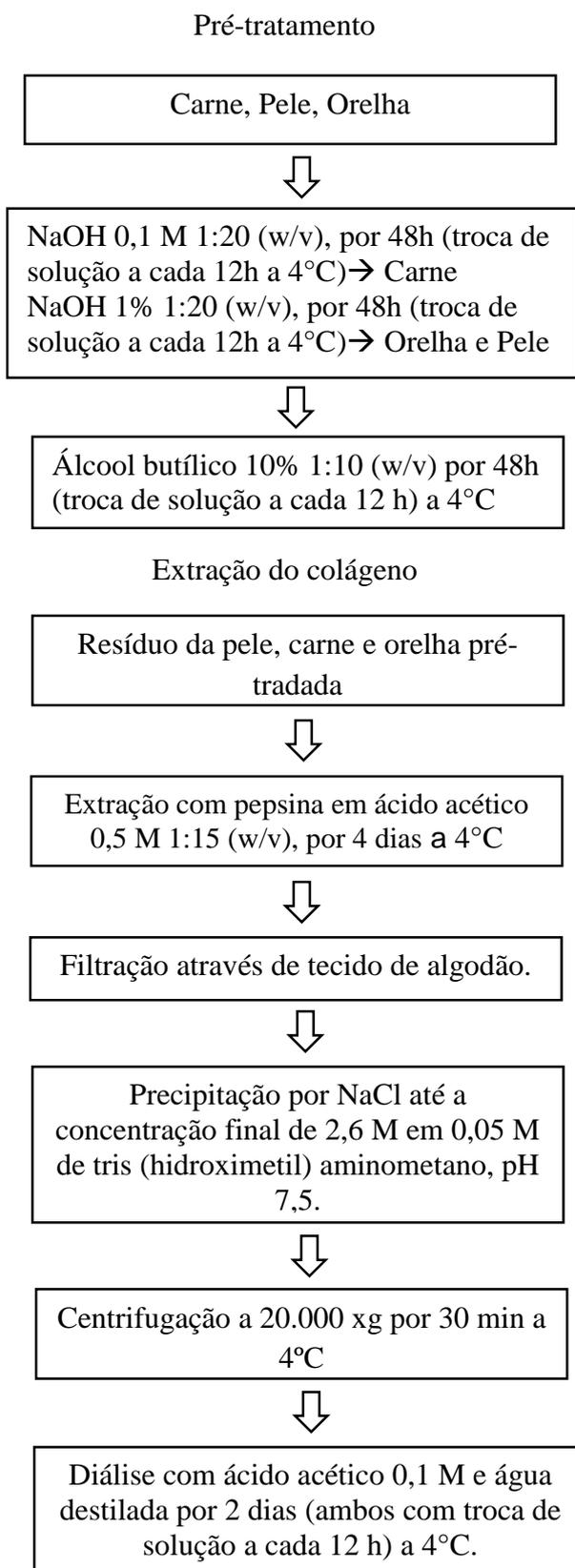
Para caracterização das matérias primas foram realizadas as seguintes determinações: pH (determinação eletrométrica, 943.02), lipídios (extração direta em Soxhlet, 920.39), proteínas (método Kjeldahl, 981.10, fator de conversão 6,25), umidade (em estufa a 105 °C, 950.46), cinzas (incineração a 550 °C, 920.153), seguindo metodologias da AOAC (2016).

2.2 Hidroxiprolina

A quantificação da hidroxiprolina foi determinada pelo método colorimétrico descrito por Kolar (1990). As amostras foram pesadas e hidrolisadas em ácido sulfúrico

3,5M em estufa de circulação de ar por 16h a 103°C. Em seguida foram filtradas, diluídas e oxidadas com cloramina T. Após a adição de 4-dimetilaminobenzaldeído, uma cor vermelho-púrpura é desenvolvida, que é medida no espectrofotômetro a 558nm.

2.2 Obtenção dos colágenos



2.3 Pré-tratamento

O pré-tratamento da carne, orelha e pele de coelho foi realizado adaptado da metodologia de Li et al. (2013) e Duan, Zhang, Du, Yao, & Konno (2009) adaptada. As proteínas não colagenosas da carne foram removidas com solução de hidróxido de sódio (NaOH) 0,1M por dois dias, com razão amostra/solução alcalina 1:20 (p/v), com troca da solução a cada 12 horas. Já as proteínas não colagenosas e os pelos da pele e orelha foram removidos com NaOH 1% por dois dias, com razão amostra/solução alcalina 1:20 (p/v), com troca da solução a cada 12 horas. A gordura foi removida utilizando uma solução de álcool butílico 10% por dois dias, com razão sólido/solvente de 1:10 (p/v), com troca do solvente a cada 12 horas. Todos os processos foram realizados sob agitação em Incubadora Shaker (Solab SL-223, Piracicaba, Brasil) a 150 rpm e 4 °C.

2.4 Extração enzimática

Após o pré-tratamento da carne, pele e orelha os colágenos foram extraídos com pepsina seguindo a metodologia proposta por Kittiphattanabawon, Benjakul, Visessanguan, Kishimura & Shahidi (2010) adaptada. Foi adicionado ácido acético 0,5 M, contendo a enzima pepsina (extraída da mucosa gástrica porcina, em pó, ≥ 400 unidades/mg de proteína, Alphatec), na proporção 1:1,5 enzimas/proteínas, com razão sólido/solvente de 1:15 (p/v) em Erlenmeyer. A solução foi agitada constantemente em Incubadora Shaker (Solab SL-223, Piracicaba, Brasil) a 150 rpm e 4 °C por 4 dias.

Em seguida foi realizada a filtração, e 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 rpm 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 cutoff 14.000 KDa, Sigma, St. Louis, USA), com ácido acético 0,1 M por dois dias 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

O rendimento do colágeno foi calculado com base no peso úmido e seco do material:

Rendimento (massa/massa) %:

$$\% = \frac{\text{Peso do colágeno liofilizado(g)} \times 100}{\text{Peso inicial(úmido ou seco) dos extratos colagênicos de coelho (g)}}$$

2.6 Caracterização do colágeno

2.6.1 Composição centesimal

Foram determinados lipídios (920.39), proteínas (981.10, fator de conversão 5,55), umidade (950.46) e cinzas (920.153), conforme AOAC (2016). A hidroxiprolina foi determinada conforme método descrito por Kolar (1990).

2.6.2 Espectroscopia de Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR)

As características estruturais foram avaliadas através da análise de Espectroscopia de Infravermelho com Transformada de Fourier – FTIR em equipamento Shimadzu IR Prestige-21 (Shimadzu Corporation, Japan) utilizando a técnica de reflectância total atenuada (ATR) no intervalo de 400 a 4.500 cm^{-1} , com varreduras de 45 scans e resolução de 2 cm^{-1} . Os granulados foram produzidos misturando 100 mg de KBr e aproximadamente 1 mg de amostra liofilizada e prensados em uma prensa hidráulica HAND PRESS SSP-10A.

2.6.3 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. Foram pesados 5 mg de amostras e adicionado 50 μL de β -mercaptoetanol para 950 μL de tampão de amostra e em seguida, colocadas em banho maria a 95°C por 5 minutos.

Foram utilizados gel de resolução 10% e gel de empilhamento 4%. Estes géis foram colocados nas placas para polimerização. Após injetou-se 10 μL do padrão de massa molar, 10 μL do tendão cauda de rato e as amostras a serem analisadas e submeteu-se a corrida realizada, num tempo de aproximadamente 1 hora, 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 solução de etanol 10%, ácido acético 7% e água deionizada até a perfeita visualização das bandas.

2.6.4 Avaliação das propriedades tecnológicas do colágeno

2.6.4.1 Solubilidade

A solubilidade foi determinada pelo método de Montero, Jimenez & Borderias (1991), com ligeiras 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 para 1,0 – 10,0, com NaOH a 6 M ou HCl 6 M. O volume final foi ajustado a 10 mL com água destilada previamente ajustada para o mesmo pH que a solução de colágeno. As soluções foram lentamente agitadas a 4 °C durante 20 minutos e centrifugadas a 10.000g a 4°C durante 30 minutos. O teor de proteína no sobrenadante foi determinada pelo método de Lowry, Rosebrough, Farr & Randall (1951), utilizando albumina de soro bovino como padrão. A solubilidade relativa do colágeno foi calculada em comparação com a obtida no pH com maior solubilidade, tornando esta em 100%.

2.6.4.2 Propriedades da Espuma

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

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

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

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, 5, 10, 30 e 60 min, sendo a estabilidade calculada pela equação:

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

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

2.6.4.3 Propriedades emulsificantes:

O índice de atividade emulsionante (EAI) e o índice de estabilidade da emulsão (ESI) foram calculados com base no método de Pearce & Kinsella (1978). Óleo de soja (10 mL) e solução de amostra (30 mL, 0,1%) foram misturados em ultra homogeneizador Turrax (Tecnal TE-102 Piracicaba, Brasil) a uma velocidade de 12.000 rpm durante 1 min, e 100 μ 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:

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

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

2.6.4.4 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, ≥ 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 hidrólise 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.

2.7 Análise estatística

As análises foram realizadas por delineamento inteiramente casualizado (DIC) com três tratamentos (pele, orelha e carne). Todas as análises foram realizadas com três repetições, e as médias então, foram avaliadas. A análise estatística foi realizada pelo SAS® *system for windows*™ versão 9.4 (SAS institute Inc.: Cary – NC - USA). Análise de variância (ANOVA), utilizando o procedimento General Linear Model e as diferenças entre os meios foram analisadas pelo teste de Student-Newman-Keuls ao nível de significância de 5%. Os dados de solubilidade dos diferentes extratos colagênicos de coelho em função da variação do pH foram ajustados por função empírica sigmoideal (logística), conforme o modelo estatístico:

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

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

Com o intuito de verificar a igualdade dos parâmetros e a identidade das equações de regressão não-linear ajustadas para os diferentes colágenos, aplicou-se o teste da razão de verossimilhança com aproximações dadas pelas estatísticas χ^2 e F (Regazzi & Silva, 2004). As hipóteses testadas foram:

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

$$F_{calc}(H_0) = \frac{(S_p - S_f)/\nu_e}{S_f/\nu_f} \underset{H_0}{\sim} F_{tab}(\alpha; \nu_e; \nu_f)$$

em que, $F_{calc} = F$ calculado; S_p = soma de quadrados residuais do modelo reduzido (sob restrição); S_f = soma de quadrados residuais do modelo completo; ν_f = número de graus de liberdade do resíduo do modelo completo; ν_e = número de graus de liberdade do resíduo do modelo reduzido menos o número de graus de liberdade do resíduo do modelo completo; $F_{tab} = F$ tabelado; α = como definido anteriormente. As análises estatísticas foram realizadas no aplicativo SAS[®] *System for Windows*[™] versão 9.4 (SAS Institute Inc., Cary - NC, USA), ao nível de 5% de significância.

Para obtenção dos espectros de FTIR testou-se a primeira e segunda derivadas dos espectros de FTIR utilizando o procedimento EXPAND com o propósito de lineariza-los. Posteriormente, os dados espectrais linearizados (1ª ou 2ª derivada) foram sujeitos a análise de variância multivariada (MANOVA) complementada pela técnica de componentes principais utilizando os procedimentos GLM, PRINQUAL, PRINCOMP e FACTOR, conforme descrito por Khattree & Naik (2000).

3. Resultados e discussões

3.1 Caracterização da matéria-prima

Observa-se que a carne, pele e orelha apresentaram elevados teores de proteína em base úmida (Tabela 1), sendo a pele mais ($P < 0,05$) proteica. Resultados inferiores para a pele (14,56% na base úmida) foram relatados por Yu et al (2016), possivelmente devido a idade de abate dos animais, pois, Tejada & Soares. (1995) relatam em seu estudo que coelhos jovens possuem um menor teor de proteína na pele do que coelhos mais velhos.

Os teores de minerais das matérias primas na base natural foram relativamente baixos, menor que 1% e, não diferiram ($P > 0,05$) entre si (Tabela 1). Yu et al (2016) reportaram resultado superior para a pele (1,35%), possivelmente pela diferença da raça e da classe sexual dos coelhos.

Os teores de umidade diferiram entre si ($P < 0,05$) e foram maiores ($P < 0,05$) para a carne e menores ($P < 0,05$) para a pele (Tabela 1). Valores semelhantes foram encontrados por Dalle Zotte (2002) para a carne de coelho (70,8%).

Em contrapartida, o conteúdo lipídico foi maior ($P < 0,05$) para a pele e menor ($P < 0,05$) para a carne (Tabela 1). Lima, Carneiro & Moura (2007) reportou valores de 3,1 a 5,1% para a carne de coelho, corroborando com o encontrado neste estudo. Segundo Dalle Zotte (2014), os teores lipídicos da carne de coelho podem apresentar diferenças, pois, dependem da porção considerada, fator produtivo e da alimentação do animal.

A orelha de coelho apresentou maior ($P < 0,05$) teor de colágeno, tanto na base natural quanto na base seca (Tabela 1). Os resultados encontrados nesse estudo foram superiores aos relatados por Schmidt (2018) para resíduo de CMS de frango (6,22%, em base seca) e por Vidal et al. (2020) para subprodutos de ovinos e cordeiro (12,3% e 8,88%, em base seca), apenas a carne foi inferior ao encontrado por Vidal et al. (2020). A relação colágeno/proteína para as diferentes partes do coelho (Tabela 1), confirmam que a pele e orelhas são excelentes alternativas para obtenção de extratos colagênicos.

Não houve diferença ($P > 0,05$) nos valores de pH para as diferentes partes do coelho, com média de 6,58 (Tabela 1), ou seja, próximo da neutralidade. Essa faixa de pH é favorável ao desenvolvimento de microrganismos, por isso é necessário armazená-los sob congelamento (Schmidt, 2018).

3.2 Caracterização do colágeno

3.2. 1 Composição centesimal dos extratos de colágenos

O extrato colagênico de orelha apresentou maior ($P < 0,05$) teor de umidade que os de carne e pele (Tabela 2). Isto, devido as células do tecido cartilaginoso (condrócitos) reterem maior umidade durante o processo de secagem. Pois, a matriz do tecido cartilaginoso é relativamente rígida e formada por colágeno ou por colágeno com elastina, além de glicoproteínas, proteoglicanas e ácido hialurônico (Junqueira; Carneiro, 2008). Valores semelhantes foram reportados por See, Hong, Ng, Wan & Babji (2010) para gelatina de peixe-gato (11,04%); por Alfaro, Biluca, Marquetti, Tonial & Souza (2014) para gelatina de pele de African Catfish - *Clarias gariepinus* (12,4%) e por Vidal et al. (2019) para gelatina comercial (10,6%).

Nota-se que as proteínas são o principal constituinte dos extratos colagênicos de carne, pele e orelha de coelhos (Tabela 2), tanto na base natural como na matéria seca. Valores inferiores foram relatados por Vidal et al. (2020) para subprodutos de ovelha (65%) e cordeiro (70,8%) em base natural.

Os teores de minerais encontrados no colágeno da carne, pele e orelha (Tabela 2) diferiram ($P < 0,05$) entre si, sendo que o extrato colagênico da orelha apresentou o maior ($P < 0,05$) teor de minerais e o da carne o menor ($P < 0,05$), os mesmos foram inferiores aos encontrados por Schmidt (2018) para resíduo de CMS de frango (3,74%), Oechsle et al. (2016) para colágeno da pele de frango (3,86%), e por Fontoura (2019) para carcaça e resíduo da carcaça de tilápia (3,74 e 2,90%). Segundo Vidal et al. (2019) os diferentes conteúdos de minerais encontrados podem ser devido aos diferentes tipos de matérias-primas utilizadas na extração de colágeno.

O extrato de colágeno da carne teve maior ($P < 0,05$) teor de lipídios; sendo superior ao encontrado por Prestes et al. (2013) para fibra de colágeno bovino (1,44%), semelhante ao encontrado por Vidal et al. (2020) para subproduto de cordeiro (16,7%), e inferior ao encontrado por Vidal et al. (2020) para subproduto de ovelha (24,5%). Os altos valores de lipídeos encontrados nesse estudo para colágeno da carne sugerem que o método empregado no pré-tratamento para remoção de lipídeos não foi eficiente. Talvez, o uso de isopropanol 30% no pré-tratamento poderia ter reduzido os lipídios, particularmente os fosfolipídios de membrana (Sae-Leaw, Benjakul & Brien, 2016).

O extrato de colágeno da orelha apresentou maior ($P < 0,05$) teor de colágeno, tanto na base natural quanto na base seca, seguido da pele e carne (Tabela 2). Sabe-se que a presença de hidroxiprolina é muito importante pois estabiliza a hélice do colágeno de cadeia tripla devido à sua capacidade de ligação de hidrogênio através do seu grupo OH, sendo assim, uma menor quantidade ou falta de hidroxiprolina pode resultar na perda da conformação da estrutura secundária da proteína quando submetida a elevadas temperaturas (Burjandze, 1979; Gómez-Guillén, Fernández-Díaz, Ulmo, Lizarbe & Montero, 2002). A relação colágeno/proteína para os diferentes extratos colagênicos do coelho (Tabela 2) foi maior ($P < 0,05$) para colágeno da orelha e menor ($P < 0,05$) para colágeno da carne. Esses resultados confirmam o potencial para se extrair colágeno da orelha e da pele.

O extrato de colágeno da carne apresentou menor ($P < 0,05$) valor de pH (Tabela 2) e o da orelha o maior pH. Todavia, esta diferença pode ser considerada desprezível e sem significado prático, pois, todos os extratos colagênicos obtiveram valor de pH abaixo do ponto isoelétrico (pI); sendo 5,13 para carne, 4,85 para pele e 5,26 para orelha (Figura 2). O pH ácido dos extratos colagênicos, com valor médio de 4,51, deve-se ao tratamento ácido enzimático utilizado na extração dos mesmos.

.3.2.2 Rendimento

Os rendimentos (massa/massa) dos diferentes extratos colagênicos de coelho solubilizado com pepsina (Tabela 2) foi maior ($P < 0,05$) para colágeno da pele tanto na base natural quanto na base seca e menor ($P < 0,05$) para colágeno da carne. O rendimento dos extratos colagênicos da pele e orelha foram ligeiramente superior ao encontrado por Zhang & Duan (2017) que obtiveram um rendimento de 19,59% para pele de sapo, mas foi superior ao colágeno da carne (9,05%). Entretanto, os rendimentos dos colágenos dos três tratamentos foram inferiores ao encontrado por Wang, Pei, Liu & Zhou (2018) para pele de Loach (27,32% em peso seco), e para pele de tilápia (27,2% em peso seco) (Chen et al., 2016). O rendimento do colágeno da pele e orelha foram semelhantes ao encontrado por Veeruraj, Arumugam, Ajithkumar & Balasubramanian (2015) para pele de lula (24,6% em peso seco). A diferença nos rendimentos pode ser atribuída a diferentes fatores, tais como: matéria-prima (espécies diferentes), métodos de preparação da matéria prima diferentes e diferentes métodos de extração que foram submetidos (Zeng et al., 2012).

Nota-se que o extrato de colágeno da carne teve maior rendimento ($P < 0,05$) quando expresso como colágeno/colágeno; ao passo que o extrato de orelha obteve menor. Possivelmente, isso ocorreu pela cartilagem da orelha não ter sido tratada para aumentar sua solubilização previamente a extração. Estudos realizados por Hsueh, Khabut, Kjellström, Önnarfjord & Kraus (2016) e por Grynepas et al (1994) demonstraram que para aumentar a solubilização da cartilagem articular e do colágeno a partir da cartilagem de macacos era necessário o uso da guanidina-HCl, resultando no aumento da extração de colágeno. Além disso Hoemann (2004) descrevem que o uso de guanidina HCl 4M, ureia 8M ou tiocianato de guanidina também aumenta a solubilização da cartilagem. Talvez o uso de guanidina ou ureia aumentaria a solubilização da cartilagem da orelha deste estudo. Os rendimentos colágeno/colágeno desse estudo foram superiores ao encontrado por Wang et al. (2008) para pele, escama e ossos de cantarilhos que foi de 47,5, 6,8 e 10,3% e inferiores ao encontrado por Yu et al. (2018) para pele de Croaker Gigante (*Nibeia japonica*) que foi de 84.85%..

3.2.2 Espectroscopia de Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR).

Os espectros de FTIR dos extratos colagênicos de coelho exibiram picos característicos de Amida A e B, assim como Amida I, II, III (Figura 1). Os espectros de FTIR desse estudo foram semelhantes ao encontrado por Li et al. (2013), Yu, et al. (2016) e por Gao, Wang, Li, Zhang & Zhang (2018). A banda amida A da carne, pele e orelha foram encontradas em um número de onda de 3434 cm^{-1} , 3433 cm^{-1} e 3446 cm^{-1} , respectivamente. Geralmente, uma vibração de alongamento livre de NH ocorre entre 3400 a 3440 cm^{-1} e quando o grupo NH de um peptídeo está envolvido em uma ligação de hidrogênio, a posição é alterada para frequências mais baixas, no geral em torno de 3300 cm^{-1} (Doyle, Bendit & Blout, 1975). Os resultados indicaram que os grupos NH não estavam envolvidos em uma ligação de hidrogênio. As posições da banda da amida B para colágeno da carne, pele e orelha foram observadas em 2924 cm^{-1} , 2925 cm^{-1} e 2925 cm^{-1} , respectivamente, podendo estar relacionada com o alongamento assimétrico da vibração de estiramento de CH_2 (Abe & Krimm, 1972). O pico de amida I com frequências características nas bandas de 1600 - 1700 cm^{-1} foi observado em 1655 , 1652 e 1651 cm^{-1} para colágeno da carne, pele e orelha, respectivamente. A região da amida I é usada principalmente para análise da estrutura secundária de proteínas (Jeevithan, Wu, Nanping, Lan & Bao, 2014). A amida I está principalmente associada às vibrações de

estiramento dos grupos carbonila ao longo do esqueleto polipeptídico (Payne & Veis, 1988).

As frequências características que variam de 1550–1600 cm^{-1} , são denominadas banda de amida II, e representam vibrações de flexão N-H acopladas com vibração de estiramento C-N (Payne & Veis, 1988; Jackson, Choo, Watson, Halliday & Mantsch, 1995). As absorvâncias de banda de amida II do colágeno da carne, pele e orelha de coelho foram obtidas no número de onda de 1559 cm^{-1} , 1558 cm^{-1} e 1559 cm^{-1} , respectivamente. As frequências características que variam de 1200 a 1400 cm^{-1} , são denominadas banda de amida III, e estão associadas a vibrações de flexão N-H acopladas com vibração de estiramento C-N (Payne & Veis, 1988; Jackson, Choo, Watson, Halliday & Mantsch, 1995). As absorvâncias da banda amida III do colágeno da carne, pele e orelha estavam situadas a um número de onda de 1239 cm^{-1} , 1238 cm^{-1} , e 1238 cm^{-1} , respectivamente.

Os espectros dos colágenos da carne, pele e orelha mostraram absorções em 1080, 1081 e 1078 cm^{-1} , que estão associadas as vibrações de estiramento C-O das porções de carboidratos ligadas à proteína (Petibois, Gouspillou, Wehbe, Delage, & Deléris, 2006). Estes resultados sugerem que os colágenos podem conter carboidratos que estão ligados aos resíduos de hidroxilisina da cadeia polipeptídica por ligações O-glicosídicas (Zhou et al., 2016).

As estruturas helicoidais triplas do colágeno da carne, pele e orelha foram confirmadas a partir das taxas de absorção entre as bandas de 1239, 1238 e 1238 cm^{-1} (amida III) e 1457 cm^{-1} , obtendo-se uma razão de 0,85, 0,84 e 0,84, respectivamente. Plepis, Goissis, & Das-Gupta (1996) descreve que uma razão aproximada de 1,0 revela a estrutura tripla helicoidal do colágeno, o que comprova que neste estudo a estrutura tripla helicoidal foi mantida e não foi afetada pela pepsina no processo de extração.

3.2.4 Eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE)

Os extratos de colágenos da pele, orelha e carne foram submetidos a análise eletroforética utilizando gel de corrida de 10% e gel de empilhamento de 4% (Figura2). Os extratos colagênicos mostraram bandas com pesos moleculares que variam de 100 a 250 KDa.

Pode-se observar que as amostras apresentaram duas bandas distintas próximas a 100 KDa, correspondentes a duas subunidades α (α_1 e α_2), também foram encontradas cadeias de banda β (dímeros) próximas a 150 KDa e bandas γ (trímeros) próximas a 250 KDa, pertencentes a compostos de alto peso molecular. Resultados semelhantes foram encontrados para colágeno da pele de coelho (Martínez-Ortiz et al., 2015), gelatina da pele de coelho (Yu et al., 2016), pele de ema (Nagai, Tanoue, Kai & Suzuki, 2014) e pele de frango (Cliché, Amiot, Avezard & Gariépy, 2003).

A presença de duas cadeias α_1 e uma α_2 próximas a 100KDa demonstra que os colágenos de coelho extraídos podem ser pertencentes ao tipo I (Matmaroh, Benjakul, Prodpran, Encarnacion & Kishimuar, 2011). No entanto, no padrão eletroforético do extrato de colágeno da orelha é possível observar que não houve uma separação bem distinta das bandas α_1 e α_2 , sugerindo que pode ter dois tipos de colágeno, o tipo I e II. O uso de proteases como pepsina combinadas com ácidos tem sido bastante utilizadas na extração de colágeno devido a um aumento no rendimento da extração, isso ocorre porque a pepsina é capaz de clivar as regiões reticuladas no telopeptídeo sem danificar a integridade da hélice tripla e portanto, gera um maior rendimento (Heu et al., 2010). Entretanto, Skierka & Sadowska (2007) relatam em seu estudo que o uso da pepsina proporcionou o aparecimento de fragmentos menores de proteínas (<116KDa) devido a degradação do colágeno no processo de extração. Contrários a esses resultados, nesse estudo as bandas de baixo peso molecular (abaixo de 100KDa) não foram visíveis, demonstrando que o colágeno extraído pode ter maior pureza.

3.3 Avaliação das propriedades tecnológicas do colágeno

O colágeno pode ter diversas aplicações industriais e por isso se faz necessária a determinação das propriedades tecnológicas para assim verificar qual aplicação melhor será dada a esse colágeno.

3.3.1 Solubilidade

A Figura 3 apresenta a solubilidade (%) dos extratos colagênicos de coelho em função do pH. A curva de solubilidade estimada mostrou que a solubilidade inicial (β) e final (α) não diferem ($P > 0,05$) entre os tratamentos, a média obtida para os extratos colagênicos foi de 95,4% e 1,39%, respectivamente. Os tratamentos apresentaram diferenças significativas pH no ponto de inflexão (δ) e taxa de decréscimo na solubilidade

(κ). O ponto de inflexão, onde a solubilidade alcança 50% ocorreu em pH 5,13 para carne, 4,85 para pele e 5,26 para orelha, e a taxa de redução da solubilidade com o acréscimo dos valores de pH para colágeno da carne, pele e orelha, respectivamente, foi de -1,07, -1,54 e -4,49.

A solubilidade observada mais elevada foi obtida em pH 1 para extrato de colágeno da carne e pele e em pH 3 para extrato de colágeno da orelha. Observa-se que os colágenos mostraram uma elevada solubilidade em pH ácido, Matmaroh, Benjakul, Prodpran, Encarnacion & Kishimuar (2011) encontraram resultados parecidos para colágenos da escama de peixe-cabra dourado (*Parupeneus heptacanthus*). De modo geral, os colágenos foram solubilizados em pH ácido de 1-4, resultados estes semelhantes ao encontrado por Jongjareonrak, Benjakul, Visessanguan, Nagai & Tanaka (2005). Com o aumento do pH de 5-10 houve uma redução gradativa na solubilidade dos extratos de colágeno de coelho, sendo que a menor solubilidade foi observada em pH alcalino (8-10). Munasinghe, Schwarz & Whittiker (2015) avaliaram a solubilidade do colágeno extraído de pepsina da pele de frango nos valores de pH 2,0, 4,0, 6,0, 8,0 e 10,0, e relataram maior solubilidade no valor de pH 2,0 e menor solubilidade no valor de pH 8,0.

Comparando os resultados deste estudo com anteriores (Jongjareonrak, Benjakul, Visessanguan, Nagai & Tanaka, 2005; Liu, Li, Miao & Wu, 2009; Kittiphattanabawon, Benjakul, Visessanguan, Nagai & Tanaka, 2005) é possível verificar algumas variações na solubilidade dos colágenos com diferentes pHs. A explicação para essa diferença é devido as diferenças nas conformações moleculares do colágeno e nas propriedades físico-químicas como pI, que varia dependendo da fonte e espécies que se extrai colágeno. No pI a carga líquida total das moléculas é zero, resultando na precipitação da proteína, já quando o pH é superior ou inferior ao pI, a solubilidade é aumentada pelas forças de repulsão entre os resíduos carregados de moléculas de proteínas (Lin et al., 2002; Damodaran, Parkin & Fennema, 2010; Kittiphattanabawon, Benjakul, Visessanguan, Nagai & Tanaka 2005).

3.3.2 Propriedades da Espuma

A formação de espuma foi observada apenas nas concentrações de 0,25% e 0,5% de colágeno enquanto na concentração de 1% apresentaram consistência cremosa e sem formação de espuma (Tabela 3). Zeng et al. (2013), explica que altas concentrações de proteínas migrando para superfície das bolhas de ar podem levar a uma maior formação

e estabilidade da espuma, entretanto, neste estudo, na concentração de colágeno de 1% não ocorreu formação de espuma. Os extratos colagênicos da carne e orelha na concentração de 0,25% de colágeno tiveram maior ($P < 0,05$) formação de espuma (Tabela 3). Resultados semelhantes foram encontrados por Vidal et al. (2020) para colágeno de ovelha e cordeiro (9,58% e 15%) e por Schmidt (2018) para resíduo de CMS de frango (9,38%). O extrato colagênico da pele apresentou menor ($P < 0,05$) CFE na concentração de 0,25% (Tabela 4), acredita-se que as regiões hidrofóbicas do colágeno não ficaram expostas o suficiente para que ocorresse o desdobramento das proteínas, e assim houve uma redução na formação de espuma (Townsend & Nakai, 1983). Além disso, a CFE dos extratos colagênicos da carne e orelha reduziu ($P < 0,05$) à medida que se elevou a concentração de extrato colagênico para 0,5%. Haddar et al (2011) explica que a proteína deve ser capaz de migrar para a interface-ar-água, desdobrar-se e reorganizar a interface para obter-se uma boa formação de espuma, o que não foi possível observar na concentração de 0,5% para extrato de colágeno da carne e orelha, devido as mesmas terem uma alta concentração de proteínas impossibilitando uma boa formação de espuma nessa concentração.

A estabilidade de espuma não apresentou diferença ($P > 0,05$) entre as partes do colágeno (carne, pele e orelha) e as concentrações de 0,25% e 0,5% (Tabela 3). Ao longo dos 60 minutos de monitoramento houve irrisória diminuição da espuma, demonstrando uma formação de espuma estável dos colágenos de coelho estudados. Em geral foi possível observar que independente da concentração de colágeno (0,25 e 0,5%) a espuma se manteve estável ao longo de 60 minutos para as diferentes partes de coelho estudadas, com valores médio de 96,55%. Em contrapartida, Schmidt (2018) reportou aumento na estabilidade da espuma à medida que se elevou a concentração de colágeno de 0,25% para 1% na solução. As diferenças nos resultados de capacidade de formação de espuma podem ocorrer devido a diferença nas fontes de extração do colágeno, nas propriedades intrínsecas, composição e na conformação de proteínas em cada colágeno (Zayas, 1997).

3.3.3 Propriedades emulsificantes

O extrato colagênico da orelha apresentou maior ($P < 0,05$) e o de carne menor ($P < 0,05$) índice de atividade emulsificante – EAI (Tabela 4). Em contrapartida, ambos tiveram menor ($P < 0,05$) índice de estabilidade da emulsão. Os resultados deste estudo foram superiores ao encontrado para gelatina de pele bovina (27,02 m²/g) (Jellouli et al., 2011), pele de Grey triggerfish (21,44 m²/g) (Jellouli et al., 2011), pele de cuttlefish

(*Sepia pharaonis*) (24,30 m²/g) e gelatina de osso bovino 1% (28,27 m²/g) (Aewsiri, Benjakul & Visessanguan, 2009), possivelmente pelo fato de a solubilidade da fase de dispersão ter sido maior nos mesmos, aumentando assim a emulsificação (Sikorski, 2001).

Os resultados de estabilidade deste estudo foram inferiores aos obtidos por Aewsiri, Benjakul & Visessanguan (2009) na gelatina de ossos bovino, 31,23 min, na pele de cuttlefish (*Sepia pharaonis*), 15,14 min e por Schmidt (2018) para resíduo de CMS de frango, 13,26min. Os diferentes resultados obtidos na literatura podem ser devido a diferenças nas propriedades intrínsecas da proteínas do colágeno, composição e na conformação das proteínas das diferentes fontes de colágeno (Damodaran, 1997).

Quando a solubilidade da fase de dispersão é alta, a eficácia do emulsificante também aumenta, visto que as moléculas de proteínas podem migrar rapidamente para superfície das gotículas de gordura (Sikorski, 2001). É importante ressaltar que o colágeno por ser uma proteína insolúvel alguns fatores como concentração, pH, temperatura podem afetar suas propriedades funcionais (Asghar & Henrickson, 1982; Bhumbar, Bhagwat & Dandge, 2019). Não há estudos disponíveis até o momento sobre as propriedades emulsificante e de formação de espuma para colágeno da carne e de subprodutos de coelho.

3.3.4 Digestibilidade *in vitro*

O extrato colagênico da pele teve maior ($P < 0,05$) e da orelha menor ($P < 0,05$) digestibilidade (Tabela 4). Esses valores foram semelhantes aos encontrados por Vidal et al. (2020) para ovelha e cordeiro (29,8% e 25,6%), Zhou et al. (2016) para colágeno extraído com pepsina de pele pés de frango, 24,0% e Schmidt (2018) para resíduo de CMS de frango (29,86%). No entanto, quando comparadas com valores de digestibilidade da albumina (98,3%) (Costa, Fontana & Veiga, 2007) e a caseína (93,82%) (Neves, Silva & Silva, 2006), os valores encontrados nesses estudos são baixos.

Segundo Schmidt (2018), a baixa digestibilidade pode ser pelo uso da enzima pepsina usada na digestão, onde a mesma já foi usada na etapa de extração do colágeno. Além disso, a taxa e extensão em que as proteínas são digeridas pelo organismo depende de alguns fatores, incluindo tratamento térmico que essa fonte de colágeno foi submetida, estrutura da proteína e viscosidade (Vidal et al., 2020, Rutherford, Montoya & Moughan, 2014). Diante dos resultados do presente estudo, é provável que a estrutura da proteína tenha sido o limitante da digestibilidade, já que as estruturas dos colágenos nativos

possuem altos pesos moleculares e são mais difíceis de ser digeridas quando comparadas com colágeno hidrolisado que possuem baixo peso molecular e são mais fáceis de serem digeríveis pelo organismo devido ao aumento da solubilidade, por exemplo (Foh, Kamara, Amadou, Foh & Wenshui, 2011).

4. Conclusão:

Foi possível extrair e caracterizar os extratos de colágeno da carne, pele e orelha de coelho. Os maiores rendimentos foram encontrados para os extratos de colágeno da pele e orelha. Os extratos de colágeno apresentaram bandas correspondentes a α_1 , α_2 , β e γ , aos quais são característicos de colágeno tipo I. Os espectros de FTIR e a digestibilidade in vitro dos extratos colagênicos de coelho foram semelhantes. Os extratos de colágeno apresentaram elevada solubilidade em pH ácido, além disso, a formação de espuma foi observada nas concentrações de 0,25 e 0,5% de colágeno e a atividade emulsificante foi superior a valores encontrados para outros colágenos relatados na literatura.

Conclui-se que a pele e orelha podem ser uma fonte viável para produção de colágeno. Portanto, os colágenos de coelho podem ser uma alternativa para substituir os colágenos de bovinos e suínos, além disso, agregar valor e aproveitar os subprodutos da cunicultura.

Conflitos de interesse

Os autores declaram que não há conflito de interesse.

Referências bibliográficas

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

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

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

AOAC - Association of Official Analytical Chemists. 2016. Official Methods of Analysis

of AOAC INTERNATIONAL

Araújo, Í. B. S., Bezerra, T. K. A., Nascimento, E. S., Gadelha, C. A. A., Santi-Gadelha, T., & Madruga, M. S. (2018). Optimal conditions for obtaining collagen from chicken feet and its characterization. *Food Science and Technology*, 38, 167-173.

Asghar, A. & Henrickson, R. L. (1892). Chemical, biochemical, functional, and nutritional characteristics of collagen in food systems. *Advances in Food Research*, 28, 231-372.

Bhuimbar, M.V., Bhagwat, P. K., & Dandge, P. B. (2019). Extraction and characterization of acid soluble collagen from fish waste: Development of collagen chitosan blend as food packaging film. *Journal of Environmental Chemical Engineering*, 7(2).

Birk, D.E. & Bruckner, P. (2005). Collagen suprastructures. *Topics in Current Chemistry*, 247, 185-205.

Burjandze, T.V. (1979). Hydroxyproline content and location in relation to collagen thermal stability. *Biopolymers*, 18, 931–936.

Ceuninck, F. D., Sabatini, M., & Pastoureau, P. (2004). Cartilage and Osteoarthritis. In Hoemann, C. D. (Eds), *Molecular and Biochemical Assays of Cartilage Components* (pp. 142-156), Humana Press, 346p.

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.

Cheng, F-Y., Hsu, F-W., Chang, H-S., Lin, L-C., & Sakata, R. (2009). Effect of different acids on the extraction of pepsin-solubilised collagen containing melanin from silky fowl feet. *Food Chemistry*, 113, 563–567.

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

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

- Dalle Zotte, A. (2002). Perception of rabbit meat quality and major factors influencing the rabbit carcass and meat quality. *Livestock Production Science*, v. 75, p. 11–32.
- Dalle Zotte, A. (2014). Rabbit farming for meat purposes. *Animal Frontiers*, 4, 62–67.
- Damodaran, S. (1997). Protein-stabilized foams and emulsions. In S. Damodaran & A. Paraf (Eds.), *Food proteins and their applications* (pp. 57–110). New York: Marcel Dekker Inc
- Damodaran, S., Parkin, K. L., & Fennema, O.R. (2010). *Química de Alimentos de Fennema*, 4ª ed., Artmed: Porto Alegre, 2010.
- Doyle, B. B., Bendit, E. G., & Blout, E. R. (1975). Infrared spectroscopy of collagen and collagen-like polypeptides. *Biopolymers*, 14(5), 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.
- Foh, M. B. K., Kamara, M. T., Amadou, I., Foh, B. M., & Wenshui, X. (2011). Chemical and physicochemical properties of tilapia (*Oreochromis niloticus*) fish protein hydrolysate and concentrate. *International Journal of Biological Chemistry*, Jiangsu, v. 5, n. 1, p. 21-36.
- Fontoura, A. M. (2019). Colágeno de tilápia: uma alternativa para agregar valor aos subprodutos da indústria de pescado. Dissertação de mestrado, Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos. Universidade Federal de Santa Maria 95p.
- Gao, L.-L., Wang, Z., Li, Z., Zhang, C., Zhang, D. (2018). The characterization of acid and pepsin soluble collagen from ovine bones (Ujumuqin sheep). *Journal of Integrative Agriculture* 17, 704-711.
- Goméz-Guillén, M.C., Fernández-Díaz, M.D., Ulmo, N., Lizarbe, M.A., & Montero, P. (2002). Structural and physical properties of gelatin extracted from different marine species: a comparative study. *Food Hydrocolloids*, v.16, p.25-34.
- Grynopas, M., Gahunia, H., Yuan, J., Pritzker, K., Hartmann, D., & Tupy, J. (1994). Analysis of collagens solubilized from cartilage of normal and spontaneously osteoarthritic rhesus monkeys. *Osteoarthritis and Cartilage*, 2(4), 227–234.

Haddar, A., Bougatef, A., Balti, R., Souissi, N., Koched, W., & Nasri, M. (2011). Physicochemical and functional properties of gelatin from tuna (*Thunnus thynnus*) head bonés. *Journal of Food and Nutrition Research*, 50(3), 150-159.

Heu, M. S., Lee, J. H., Kim, H. J., Jee, S. J., Lee, J. S., Jeon, Y. J., Shahidi, F., Kim, J. S. (2010). Characterization of acid- and pepsin-soluble collagens from flatfish skin. *Food Science and Biotechnology*, 19, 27-33.

Hsueh, M.-F., Khabut, A., Kjellström, S., Önerfjord, P., & Kraus, V. B. (2016). Elucidating the Molecular Composition of Cartilage by Proteomics. *Journal of Proteome Research*, 15(2), 374–388.

Jackson, M., Choo, L. P., Watson, P. H., Halliday, W. C., & Mantsch, H. H. (1995). Beware of connective tissue proteins: assignment and implications of collagen absorptions in infrared spectra of human tissues. *Biochimica et Biophysica. Acta*, 1270(1), 1-6.

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

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

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

Junqueira, L.C.; Carneiro, J. *Histologia Básica*. São Paulo:Guanabara Koogan, Ed.11, 2008, 524p.

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

Khattree, R., & Naik, D.N. (2000). *Multivariate data reduction and discrimination with SAS Software*. North Carolina: SAS Institute, 558p.

- Kim, H-W., Yeo, I-J., Hwang, K-E., Song, D-H., Kim, Y-J., Ham, Y-H., Jeong, T-J., Choi, Y-S., & Kim, C-J. (2016). Isolation and Characterization of Pepsin-soluble Collagens from Bones, Skins, and Tendons in Duck Feet. *Korean Journal For Food Science of Animal Resources*, 36(5), 665-670.
- Kittiphattanabawon, P., Benjakul, S., Visessanguan, W., Kishimura, H., & Shahidi, F. (2010). Isolation and Characterisation of collagen from the skin of brownbanded bamboo shark (*Chiloscyllium punctatum*). *Food Chemistry*, 119(4), 1519-1526.
- Kittiphattanabawon, P., Benjakul, S., Visessanguan, W., Nagai, T., & Tanaka, M. (2005). Characterisation of acid-soluble collagen from skin and bone of bigeye snapper (*Priacanthus tayenus*). *Food Chemistry*, 89, 363-372.
- Kolar, K. (1990). Colorimetric Determination of Hydroxyproline as Measure of Collagen Content in Meat and Meat Products - NMKL Collaborative Study. *J. AOAC* , 73(1), 54-57.
- Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 22, 680-685.
- Li, Z., Wang, B., Chi, C., Zhang, Q., Gong, Y., Tang, J., Luo, H., & Ding, G. (2013). Isolation and characterization of acid soluble collagens and pepsin soluble collagens from the skin and bone of Spanish mackerel (*Scomberomorus niphonius*). *Food Hydrocolloid*, 31, 103-113.
- Lima, K. A. O., Carneiro, M. I. F., & Moura, D. J. (2007). A composição química da carne de coelhos submetidos a diferentes densidades populacionais. *Bio Eng*, Campinas, 1, 173-180.
- Lin, W., Yan, L., Mu, C., Li, W., Zhang, M., & Zhu, Q. (2002). Effect of pH on gelatin self-association investigated by laser light scattering and atomic force microscopy. *Polym Int.*, 51, 233-238.
- Lin, Y. K. & Liu, D. C. (2006a). Comparison of physicalchemical properties of type I collagen from different species. *Food Chemistry*, .99, 244-251.

- Lin, Y. K. & Liu, D. C. (2006b). Effects of pepsin digestion at different temperatures and times on properties of telopeptide-poor collagen from bird feet. *Food Chemistry*, 94, 621-625.
- Liu, D. S., Liang, L., Regenstein, J. M., & Zhou, P. (2012). Extraction and characterization of pepsin-solubilised collagen from fins, scales, skins, bones and swim bladders of bighead carp (*Hypophthalmichthys nobilis*). *Food Chemistry*, 133, 1441-1448.
- Liu, W., Li, G., Miao, Y., & Wu, X. (2009). Preparation and characterization of pepsin-solubilized type I collagen from the scales of snakehead (*ophiocephalus argus*). *Journal of Food Biochemistry* 33, 20–37.
- Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L., & Randall, R. J. (1951). Protein measurement with the folin phenol reagent. *Journal biological chemistry*, 193(1), 265-275.
- Matmaroh, K., Benjakul, S., Prodpran, T., Encarnacion, A. B., & Kishimuar, H. (2011). Characteristics of acid soluble collagen and pepsin soluble collagen from scale of spotted Golden goatfish (*Parupeneus heptacanthus*). *Food Chemistry*, 129, 1179-1186.
- Montero, P., Jimenez–Colmenero, F., & Borderias, J. (1991). Effect of pH and the presence of NaCl on some hydration properties of collagenous material from trout (*Salmoirideus Gibb*) muscle and skin. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 54, 137 – 146.
- Munasinghe, K. A., Schwarz, J. G. & Whittiker, M. (2015). Utilization of chicken by-products to form collagen films. *J. Food Process*, 1-6.
- Nagai, T., Tanoue, Y., Kai, N., & Suzuki, N. (2014). Characterization of collagen from emu (*Dromaius novaehollandiae*) skins. *Journal of Food Science and Technology*, 52(4), 2344 – 2351.
- Neves, V. A., Silva, S. I., & Silva, M. A. (2006). Isolamento da globulina majoritária, digestibilidade in vivo e in vitro das proteínas do tremçoço-doce (*Lupinus albus L.*), var. multolupa. *Ciênc. Tecnol. Alim.*, 26, 832-840.

- Oechsle, A. M., Akgün, D., Krause, F., Maier, C., Gibis, M., Kohlus, R., & Weiss, J. (2016). Microstructure and physical–chemical properties of chicken collagen. *Food Struct*, 7:29-37.
- Payne, K. J., & Veis, A. (1988). Fourier transform IR spectroscopy of collagen and gelatin solutions: deconvolution of the amide I band for conformational studies. *Biopolymers*, 27(11), 1749-1760.
- Pearce, K.N., & Kinsella, J.E. (1978). Emulsifying properties of proteins: evaluation of a turbidimetric technique. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 26, 716–723.
- Petibois, C., Gouspillou, G., Wehbe, K., Delage, J. P., & Déléris, G. (2006). Analysis of type I and IV collagens by FT-IR spectroscopy and imaging for a molecular investigation of skeletal muscle connective tissue. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 386, 1961-1966.
- Plepis, A. M. G., Goissis, G., & Das-Gupta, D. K. (1996). Dielectric and pyroelectric characterization of anionic and native collagen. *Polymer Engineering Science*, 36, 2932-2938.
- Prestes, R. C., Golunski, S. M., Toniazzo, G., Kempka, A. P. (2013). Caracterização da fibra de colágeno, gelatina e colágeno hidrolisado. *Revista Brasileira de Produtos Agroindustriais*, Campina Grande, 15(4), 375-382.
- Regazzi, A.J., & Silva, C. H. O. (2004). Teste para verificar a igualdade de parâmetros e a identidade de modelos de regressão não-linear. I. dados no delineamento inteiramente casualizado. *Revista de Matemática e Estatística*, 22(3), p.33-45.
- Rutherford, S. M., Montoya, C. A., & Moughan, P. J. (2014). Effect of Oxidation of Dietary Proteins with Performic Acid on True Ileal Amino Acid Digestibility As Determined in the Growing Rat. *J. Agric. Food Chemistry*, 62, 699–707.
- Sae-Leaw, T., Benjakul, S., & O'Brien, N. M. (2016). Effect of Pretreatments and Defatting of Seabass Skins on Properties and Fishy Odor of Gelatin. *Journal of Food Biochemistry*, 40(6), 741–753.
- Santos, M.H., Silva, R.M., Dumont, V.C., Neves, J.S., Mansur, H.S., & Heneine, L.G.D. (2013). Extraction and characterization of highly purified collagen from bovine

pericardium for potential bioengineering applications. *Materials Science and Engineering*, 33(2), 790-800.

Schmidt, M. M., (2018). Colágeno de frango: uma alternativa para agregar valor aos subprodutos da indústria avícola. Tese de Doutorado, Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos. Universidade Federal de Santa Maria 170, p.

See, S. F., Hong, P. K., Ng, K. L., Wan Aida, W. M., & Babji, A. S. (2010). Physicochemical properties of gelatins extracted from skins of different freshwater fish species. *International Food Research Journal*, 17, 809-816.

Shahidi, F., Xiao-Qing, H., & Synowiecki, J. (1995). Production and characteristics of protein hydrolysates from capelin (*Mallotus villosus*). *Food Chemistry*, 53, 285–293.

Shimokomaki, M., Olivo, R., Terra, N.N., & Franco, B. D. G. M. (2006). Atualidades em Ciência e Tecnologia de Carnes. São Paulo: Varela, 236p.

Sikorski, Z. E. (2001). Chemical and Functional Properties of Food Proteins. Boca Raton: CRC Press, p. 113-136.

Sinthusamran, S., Benjakul, S., Kishimura, H., & Zhou, P. (2013). Comparative study on molecular characteristics of acid soluble collagens from skin and swim bladder of seabass (*Hypophthalmichthys nobilis*). *Food Chemistry*, 138, 2435-2441.

Sionkowska, A., Kozłowska, J., Skorupska, M., & Michalska, M. (2015). Isolation and characterization of collagen from the skin of *Brama australis*. *International Journal of Biological Macromolecules*, 80, 605-609.

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

Song, K-M., Jung, S. K., Kim, Y. H., Kim, Y. E., & Lee, N. H. (2018). Development of industrial ultrasound system for mass production of collagen and biochemical characteristics of extracted collagen. *Food and Bioproducts Processing*, 110, 996-103.

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

- Tan, Y., & Chang, S. K. C. (2017). Isolation and Characterization of Collagen Extracted from Channel Catfish (*Ictalurus punctatus*) Skin. *Food Chemistry*, 242, 147-155.
- Tejada, M. A., & Soares, G. J. D. (1995). Influência da idade de abate, sexo e músculo na qualidade de gordura de carne de coelho (*Oryctolagus cuniculus*). *Current Agricultural Science and Technology (CAST)*, 1(3), 137-144.
- Townsend, A. A., & Nakai, S. (1983). Relationships between hydrophobicity and foaming characteristics of food proteins. *Journal of Food Science*, 48, 588-594.
- Veeruraj, A., Arumugam, M., Ajithkumar, T., & Balasubramanian, T. (2015). Isolation and characterization of collagen from the outer skin of squid (*Doryteuthis singhalensis*). *Food Hydrocolloids*, 43, 708-716.
- Vidal, A. R., Cansian, R. L., Mello, R. O., Kubota, E. H., Demiate, I. M., Zielinski, A. A. F., & Dornelles, R. C. P. (2019). Effect of ultrasound on the functional and structural properties of hydrolysates of different bovine collagens. *Food Science and Technology*, ahead of print Epub Nov 04.
- Vidal, A. R., Duarte, L. P., Schmidt, M. M., Cansian, R. L., Fernandes, I. A., Mello, R. O., & Demiate, I. M. (2020). Extraction and characterization of collagen from sheep slaughter byproducts. *Waste Management*, 102, 838–846.
- Wang, J., Pei, X., Liu, H., & Zhou, D. (2018). Extraction and characterization of acid-soluble and pepsin-soluble collagen from skin of loach (*Misgurnus anguillicaudatus*). *International Journal of Biological Macromolecules*, 106, 544–550.
- Wang, L., Liang, Q., Chen, T., Wang, Z., Xu, J., & Ma, H. (2014). Characterization of collagen from the skin of Amur sturgeon (*Acipenser schrenckii*). *Food Hydrocolloid*, 38, 104-109.
- Wang, L., An, X., Yang, F., Xin, Z., Zhao, L., & Hu, Q. (2008). Isolation and characterisation of collagens from the skin, scale and bone of deep-sea redfish (*Sebastes mentella*). *Food Chemistry*, 108(2):616-23
- Willard, J.J., Drexler, J.W., & Das, A. (2013). Plant-derived human collagen scaffolds for skin tissue engineering. *Tissue Engineering Part. A*, 19(13-14):1507-18.

- Xiong, X., Ghosh, R., & Hiller, E. (2009). A new procedure for rapid, high yield purification of type I collagen for tissue engineering, *Process Biochemistry*, 44, 1200–1212.
- Yu, F., Zong, C., Jin, S., Zheng, J., Chen, N., Huang, J., Chen, Y., Huang, F., Yang, Z., Tang, Y., & Ding, G. (2018). Optimization of Extraction Conditions and Characterization of Pepsin-Solubilised Collagen from Skin of Giant Croaker (*Nibea japonica*). *Marine Drugs*, 16(1), 29.
- Yu, W., Wang, X., Ma, L., Li, H., He, Z., & Zhang, Y. (2016). Preparation, characterisation and structure of rabbit (Hyla rabbit) skin gelatine. *International Journal of Food Science and Technology*, 51, 574–580
- Zayas, J.F. (1997). *Functionality of proteins in food*. Springer-Verlag/Harwood Academic Publishers, Berlin/UK, p. 373
- Zeng, Q-R., Zhang, M., Adhikari, B. P., & Mujumdar, A. S. (2013) Effect of Drying Processes on the Functional Properties of Collagen Peptides Produced from Chicken Skin, *Drying Technology: An International Journal*, 31, 1653-166.
- Zeng, S., Yin, J., Yang, S., Zhang, C., Yang, P., & Wu, W. (2012). Structure and characteristics of acid and pepsin-solubilized collagens from the skin of cobia (*Rachycentron canadum*). *Food Chemistry*, 135, 1975–1984.
- Zhang, J., & Duan, R. Characterisation of acid-soluble and pepsin-solubilised collagen from frog (*Rana nigromaculata*) skin. (2017). *International Journal of Biological Macromolecules*, 101, 638–642.
- Zhang, Y., Liu, W., Li, G., Shi, B., Miao, Y., & Wu, X. (2007). Isolation and partial characterization of pepsin-soluble collagen from the skin of grass carp (*Ctenopharyngodon idella*). *Food Chemistry*. 103, 906–912.
- Zhou, C., Li, Y., Yu, X., Yang, H., Ma, H., Yagoub, A. E. A., Cheng, Y., Hu, J., & Otu, P. N. Y. (2016). Extraction and characterization of chicken feet soluble collagen. *LWT-Food Science and Technology*, 74, 145-153.

Tabela 1. Propriedade física e composição química das matérias-primas utilizadas na obtenção de extratos de colágeno de coelho

Variáveis	Coelho			Média	P-value	CV ¹ , %
	Carne	Pele	Orelha			
<i>Base úmida</i>						
Umidade, %	69.1 ^a	61.8 ^c	68.2 ^b	66.3	0.0001	0.60
Minerais, %	0.80	0.73	0.81	0.78	0.1612	6.18
Lípidos, %	5.76 ^c	11.8 ^a	7.40 ^b	8.32	0.0001	2.76
Proteínas, %	24.3 ^b	25.7 ^a	23.6 ^b	24.6	0.0046	1.95
Colágeno, %	1.96 ^c	11.0 ^b	12.3 ^a	8.41	0.0001	4.02
pH, adimensional	6.47	6.50	6.75	6.58	0.1172	2.30
<i>Base seca</i>						
Minerais, %	2.58 ^a	1.91 ^b	2.56 ^a	2.35	0.0020	6.17
Lípidos, %	18.6 ^c	30.8 ^a	23.3 ^b	24.3	0.0001	3.24
Proteínas, %	78.8 ^a	67.3 ^c	74.2 ^b	73.4	0.0001	1.05
Colágeno, %	6.33 ^c	28.8 ^b	38.6 ^a	24.6	0.0001	4.35
Relação Colágeno/proteína, %	8.04 ^c	42.8 ^b	52.0 ^a	34.3	0.0001	5.57

As médias seguidas por letras minúsculas distintas na mesma linha diferem (P <0,05) entre si, de acordo com o teste Student Newman Keuls (SNK).

¹ CV (%) = coeficiente de variação;

Tabela 2. Rendimento, propriedade física e composição química dos extratos de colágeno de coelho

Variáveis	Coelho			Média	P-value	CV ¹ , %
	Carne	Pele	Orelha			
<i>Base natural</i>						
Rendimento (m/m), %	2.75 ^c	9.38 ^a	7.49 ^b	6.54	0.0001	6.03
Umidade, %	10.3 ^b	10.8 ^b	13.4 ^a	11.5	0.0001	3.23
Minerais, %	0.16 ^c	1.49 ^b	1.99 ^a	1.21	0.0001	12.1
Lípidos, %	17.1 ^a	2.48 ^b	2.73 ^b	7.45	0.0001	8.18
Proteínas, %	72.4 ^c	85.2 ^a	81.9 ^b	79.8	0.0001	0.81
Colágeno, %	50.9 ^b	71.3 ^a	72.3 ^a	64.8	0.0001	1.66
pH, adimensional	4.20 ^b	4.59 ^a	4.74 ^a	4.51	0.0194	3.78
<i>Base seca</i>						
Rendimento (m/m), %	9.05 ^b	24.4 ^a	23.8 ^a	19.1	0.0001	5.77
Rendimento (col/col), %	71.4 ^a	60.7 ^b	44.1 ^c	58.7	0.0001	4.58
Minerais, %	0.17 ^c	1.67 ^b	2.30 ^a	1.38	0.0001	11.8
Lípidos, %	19.1 ^a	2.78 ^b	3.16 ^b	8.34	0.0001	7.93
Proteínas, %	80.7 ^b	95.5 ^a	94.5 ^a	90.3	0.0001	0.80
Colágeno, %	56.8 ^c	79.9 ^b	83,5 ^a	73.4	0.0001	1.41
Relação colágeno/proteína %	70.3 ^c	83.7 ^b	88.3 ^a	80.8	0.0001	2.06

As médias seguidas por letras minúsculas distintas na mesma linha diferem (P <0,05) entre si, de acordo com o teste Student Newman Keuls (SNK).

¹ CV (%) = coeficiente de variação;

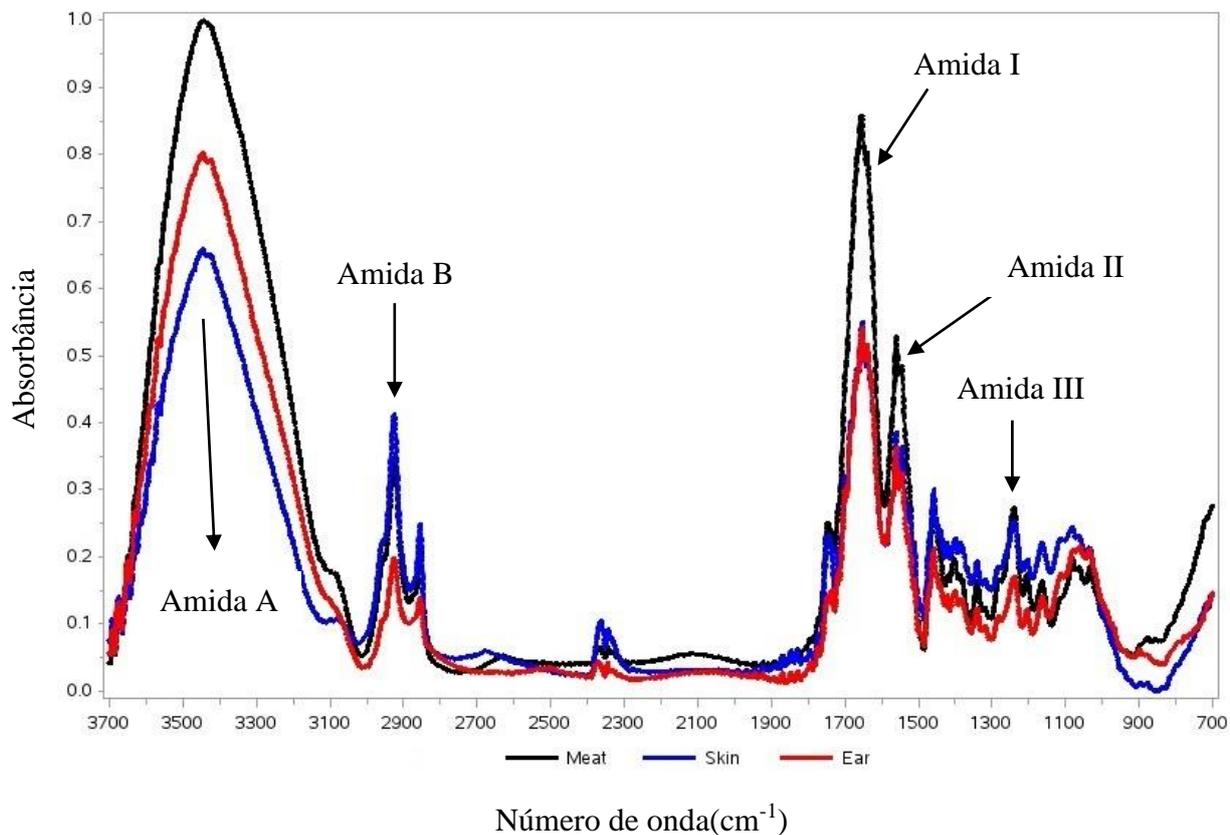


Figura 1: Espectro de FTIR dos extratos de colágeno de coelho.

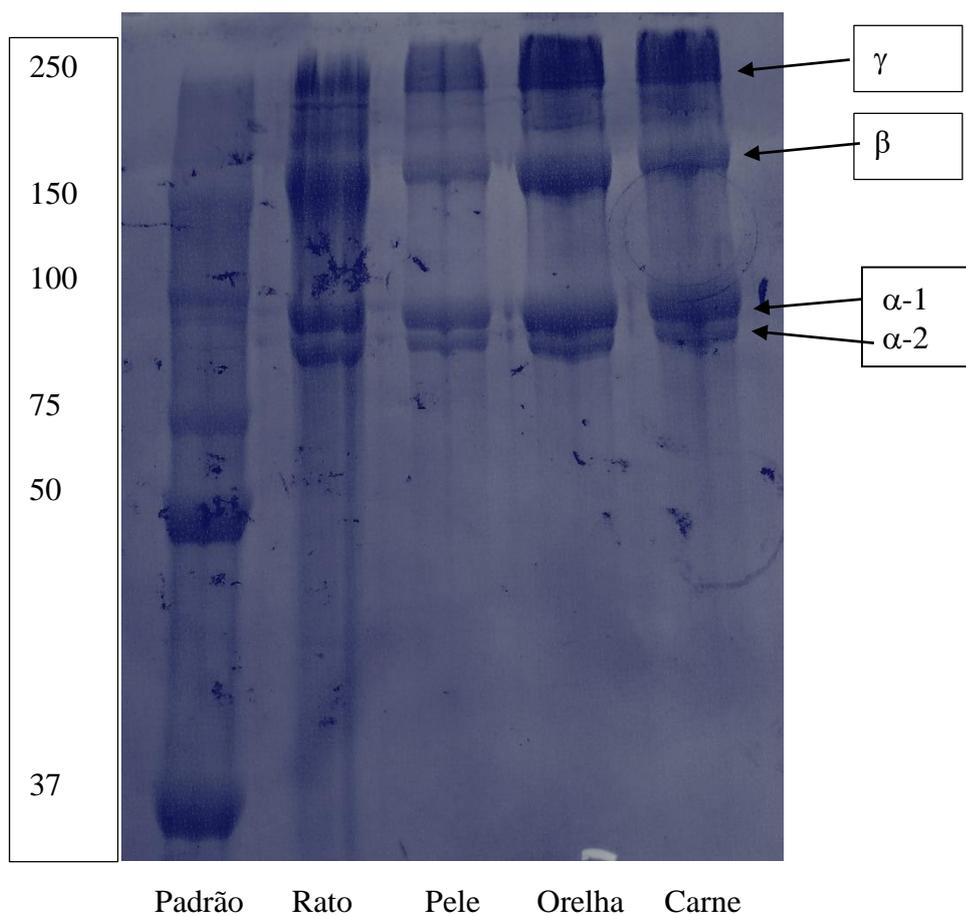


Figura 2: Eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) dos extratos de colágeno de coelho.

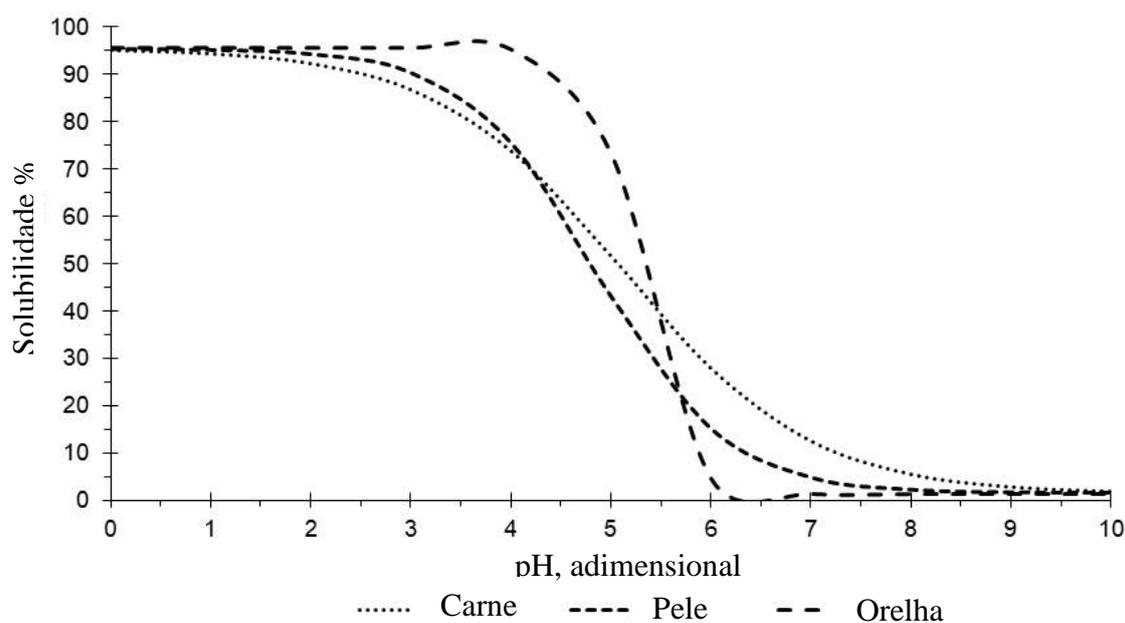


Figura 3. Curvas de solubilidade em função do pH (0 a 10) ajustadas dos extratos de colágeno de coelho.

5. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Conforme dados recentes da FAOSTAT referente ao ano de 2017 é possível observar que a produção de coelhos no Brasil ainda é insignificante, sendo correspondente a cerca de 1307 toneladas de carne. Em relação a produção mundial, a China é um dos países que domina o mercado de produção e abate de coelhos, e corresponde a uma produção de 584.849 mil cabeças, e 931.834 toneladas de carne no ano de 2017. Apesar da baixa produção no Brasil quando comparada com países como a China, a cunicultura é uma atividade muito importante para o Brasil que deve ser explorada, visto que, para criação de coelhos é necessário pouco investimento, pouco espaço na propriedade, além de permitir aproveitamento de praticamente todos os derivados como pele, orelha, urina, etc, tornando-a uma atividade sustentável.

Os subprodutos e a carne de coelho estudados são fontes ricas em proteínas, sendo assim podem produzir colágenos. Os colágenos são biomoléculas de alto valor comercial que podem ser extraídos por diferentes fontes de animais, sendo assim os colágeno de coelho podem ser uma alternativa ao colágeno de bovinos, suínos, aves e ao colágeno sintético, apresentando vantagens pela ausência de transmissão de doenças como BSE e febre aftosa.

6. SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

Para trabalhos futuros sugerimos a hidrólise dos extratos de colágeno da carne, pele e orelha de coelho com diferentes enzimas, a otimização do pré-tratamento para melhorar remoção de gordura em menor tempo de processo, além disso, otimização da extração de colágeno dessas matérias primas, com objetivo de aumentar o rendimento da extração dos mesmos.

7. CONCLUSÃO

A pele e orelha de coelho mostraram ser uma fonte viável para extração de colágeno, sendo possível agregar valor aos subprodutos oriundos da cunicultura, visto que as estruturas helicoidais foram mantidas e obteve-se um bom rendimento de colágeno liofilizado.

A utilização dos mesmos é recomendável já que pele de coelhos abatidos com até 90 dias não são boas para confecção de casacos e afins, sendo assim a sua utilização para obtenção de colágeno é uma alternativa promissora.

Desta forma, conclui-se através deste estudo que os subprodutos de coelhos são fontes promissoras para extração colágeno, tornando-se uma alternativa para aplicação industrial.

8. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ARUMUGAM, G. K. S., SHARMA, D., BALAKRISHNAN, R. M., ETTIYAPPAN, J. B. P. Extraction, optimization and characterization of collagen from sole fish skin. **Sustainable Chem Pharm**, v. 9, p.19-26, 2018.

BHUIMBAR, M.V., BHAGWAT, P. K., DANDGE, P. B. Extraction and characterization of acid soluble collagen from fish waste: Development of collagenchitosan blend as food packaging film. **Journal of Environmental Chemical Engineering**, v.7(2), 2019.

BIRK, D. E., FITCH, J. M., BABIARZ, J. P., LINSENMAYER, T. F. Collagen type I and type V are present in the same fibril in the avian corneal stroma. **The Journal of Cell Biology**, v. 106, p. 999-1008, 1988.

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

COZZA, N., BONANI, W., MOTTA, A., MIGLIARESI, C. Evaluation of alternative sources of collagen fractions from *Loligo vulgaris* squid mantle. **International Journal of Biological Macromolecules**, v.87, p.504–513, 2016.

DALLE ZOTTE, A. Perception of rabbit meat quality and major factors influencing the rabbit carcass and meat quality. **Livestock Production Science**, v. 75, p. 11–32, 2002.

DALLE ZOTTE A. Avantage diététiques. Le lapin doit apprivoiser le consommateur. **Viandes Produits Carnes**, v.23(6), p.161–167, 2004.

DALLE ZOTTE, A. Rabbit farming for meat purposes. **Animal Frontiers**, v.4, p.62–67, 2014.

DAMODARAN, S.; PARKIN, K. L.; FENNEMA, O.R. Química de Alimentos de Fennema, 4ª ed., Artmed: Porto Alegre, 2010.

DEMAN, J.M. Proteins: Animal proteins. In: Principles of food Chemistry. Aspen Publishers, p.147-149, 1999.

DENIS, A., BRAMBATI, N., DESSAUVAGES, B. Molecular weight determination of hydrolyzed colagens. **Food hydrocolloids**, v.22 (6), p.989-994, 2008.

ECKHARDT, D. P. Potencial fertilizante de adubos orgânicos à base de esterco bovino e sua utilização na produção de mudas de alface. 2011. Santa Maria, RS, 58 f. Dissertação (Mestrado em Ciência do Solo). Universidade Federal de Santa Maria, UFSM.

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

FERREIRA, W. M., MACHADO, L.C., JARUCHE, Y. G., CARVALHO, G. G., OLIVEIRA, C. E. A., SOUZA, J. D. S., CARISSÍMO, A. P. G.. Manual prático de cunicultura, 2012. Disponível em: <<http://world-rabbit-science.com/Developping/Fichiers-pdf/Manual-pratico-decunicultura-2012.pdf>>. Acesso em: 04 dezembro de 2019.

FESSLER, L. I.; BROSH, S.; CHAPIN, S.; FESSLER, J. H. Tyrosine sulfation in precursors of collagen V. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 261, p. 5034-5040, 1986.

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS. **Faostat – Production: livestock primary: rabbit meal, 2016**. Disponível em:<<http://faostat3.fao.org/faostat-gateway/go/to/download/Q/QA/E>>. Acesso em: 15 de dezembro de 2019

FORRESTER-ANDERSON, I. T., MCNITT, J., WAY, R., & WAY, M. Fatty acid content of pasture-reared fryer rabbit meat. **Journal of Food Composition and Analysis**, v.19(6-7), p.715–719, 2006.

GELSE, K., POSCHLB, E., AIGNERA, T. Collagens – structure, function and biosynthesis. **Advanced drug Delivery Reviews**, v.55, p. 1531 – 1546, 2003.

GÓMEZ-GUILLÉN, M.C., GIMÉNEZ, B., LÓPEZ-CABALLERO, M.A., MONTERO, M.P. Functional and bioactive properties of collagen and gelatin from alternative sources: A review. **Food Hydrocolloids**, v.25 (8), p. 1813-1827, 2011.

HASHIM, P., MOHD RIDZWAN, M. S., BAKAR, J., MAT HASHIM, D. Collagen in food and beverage industries. **International Food Research Journal**, v.22 (1), p. 1-8, 2015..

HUANG, C.Y., KUO, J. M., WU, S. J., TSAI, H. T. Isolation and characterization of fish scale collagen from tilapia (*Oreochromis sp.*) by a novel extrusion–hydro-extraction process. **Food Chemistry**, v.190, p.997-1006, 2016.

JUNQUEIRA, L.C.; CARNEIRO, J. Histologia Básica. São Paulo:Guanabara Koogan, Ed.11, 2008, 524p.

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

KARIM, A. A., & BHAT, R. Gelatin alternatives for the food industry: recent developments, challenges and prospects. **Food Science e Technology**, v.19 (12), p.644-656, 2008.

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

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

KIM, H-W., YEO, I-J., HWANG, K-E., SONG, D-H., KIM, Y-J., HAM, Y-H., JEONG, T-J., CHOI, Y-S., KIM, C-J. Isolation and Characterization of Pepsin-soluble Collagens from Bones, Skins, and Tendons in Duck Feet. **Korean Journal For Food Science of Animal Resources**, v.36(5), p.665-670, 2016

KITTIPHATTANABAWON, P., BENJAKUL, S., VISESSANGUAN, W., KISHIMURA, H., SHAHIDI, E. Isolation and Characterisation of collagen from the skin of brownbanded bamboo shark (*Chiloscyllium punctatum*). **Food Chemistry**. v.119, p.1519-1526, 2010.

KITTIPHATTANABAWON, P., BENJAKUL, S., VISESSANGUAN, W., NAGAI, T., TANAKA, M. Characterisation of acid-soluble collagen from skin and bone of bigeye snapper (*Priacanthus tayenus*). **Food Chemistry**, v.89, p.363-372, 2005.

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**, v.10, p.39-45, 2017.

LI, D., UM, C., CAI, S., LIN, W. Ultrasonic irradiation in the enzymatic extraction of collagen. **Ultrasonic Sonochemistry**, v.16, p.605-609, 2009.

LIANG, Q., WANG, L., SUN, W., WANG, Z., XU, J., MA, H. Isolation and characterization of collagen from the cartilage of Amur sturgeon (*Acipenser schrenckii*). **Process Biochem**, v.49 (2), 318-323, 2014.

LIN, Y. K. & LIU, D. C. Comparison of physicalchemical properties of type I collagen from different species. **Food Chemistry**, v.99, p.244-251, 2006a.

LIN, Y. K. & LIU, D. C. Effects of pepsin digestion at different temperatures and times on properties of telopeptide-poor collagen from bird feet. **Food Chemistry**. v.94, p. 621-625, 2006b.

GAO, L-L., WANG, Z., LI, Z., ZHANG, C., ZHANG, D. The characterization of acid and pepsin soluble collagen from ovine bones (*Ujumuqin sheep*) **Journal of Integrative Agriculture**, v.17 (3), p. 704–711, 2018.

LIU, D., WEI, G., LI, T., HU, J., LU, N., REGENSTEIN, J. M., ZHOU, P. Effects of alkaline pretreatments and acid extraction conditions on the acid-soluble collagen from grass carp (*Ctenopharyngodon idella*) skin. **Food Chemistry** v.172, p.836-843, 2015.

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

LOPES, L. M. A. Produção intensiva de carne de coelho: Implementação de um sistema de racionamento alimentar. 2017. Porto, 30p. Relatório Final de Estágio (Mestrado Integrado em Medicina Veterinária). Universidade do porto-Instituto de ciências biomédicas Abel Salazar.

LOSSO, J. N., OGAWA, M. Thermal stability of chicken keel bone collagen. **Journal of Food Biochemistry**, v.38, p. 345-351, 2014.

MACHADO, L. C. Opinião: Panorama da cunicultura Brasileira. **Revista Brasileira de Cunicultura (ACBC)**. v.2(1), 2012.

MACHADO, L. C.; FERREIRA, W. M. A Cunicultura e o Desenvolvimento Sustentável. **ACBC**, 2011. Disponível em: <<http://acbc.org.br/site/index.php/notas-tecnicas/a-cunicultura-e-o-desenvolvimento-sustentavel>>. Acesso em: 05 dezembro 2019.

MACHADO, L. C.; FERREIRA, W.M. Opinião: Organização e estratégias da cunicultura brasileira –buscando soluções. **Revista Brasileira de Cunicultura**, v.2 (1), 2014.

MARTÍNEZ-ORTIZ, M. A., HERNÁNDEZ-FUENTES, A. D., PIMENTEL-GONZÁLEZ, D.J., CAMPOS-MONTIEL, R.G., VARGAS-TORRES, A., AGUIRRE-ÁLVAREZ, G. Extraction and characterization of collagen from rabbit skin: partial characterization. **Journal of Food**, v.13 (2), pp. 253-258, 2015.

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.

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

MENDELER, M., EICH-BENDER, S. G., VAUGHAN, L., WINTERHALTER, K. H., BRUCKNER, P. Cartilage contains mixed fibrils of collagen types II, IX and XI. **The Journal of Cell Biology**, v. 108, p.191-197, 1989.

MICHELINI, R.P.; NADAI, A.C.; KAMEI, C.A.K.; SANTANA, J.; YAMADA, E.A, ANDRADE, J.C.; LEMOS, A.L.S.C. Elaboração de hambúrguer bovino com baixo teor de gordura adicionado de colágeno. **IV Congresso Brasileiro de Ciência e Tecnologia de Carnes**, Anais, Campinas, pp.378-380, 2007.

MORALES, D. S. A. Resíduos sólidos de bovinos proveniente da estação de tratamento de efluentes de um frigorífico pelo processo de compostagem e vermicompostagem na produção de mudas de alface. 2011. Santa Maria, RS, 82 f. Dissertação (Mestrado em Ciência do Solo) - Universidade Federal de Santa Maria, UFSM.

MURALIDHARAN, N., JEYA SHAKILA, R., SUKUMAR, D., G. Skin, bone and muscle collagen extraction from the trash fish, leather jacket (*Odonus niger*) and their characterization. **Journal of Food Science and Technology**, v.50, n.6, p.1106–1113, 2013.

OLIVO, R.; SHIMOKOMAKI, M. Carnes: No caminho da pesquisa. 2 ed. Cocal do Sul: Imprint, pp. 155, 2002.

PRESTES, R. C. Efeitos da adição de Colágeno na qualidade de presunto de frango. 2011. Erechim, RS, 188 f. Tese (Programa De Pós-Graduação em Engenharia De Alimentos) - Universidade Regional Integrada Do Alto Uruguai E Das Missões, URI.

PRESTES, R. C., GOLUNSKI, S. M., TONIAZZO, G., KEMPKA, A. P. Caracterização da fibra de colágeno, gelatina e colágeno hidrolisado. **Revista Brasileira de Produtos Agroindustriais**, Campina Grande, v.15(4), p. 375-382, 2013.

RICARD-BLUM, S. The collagen family. Cold Spring Harbor Perspectives in Biology, v.3, p. 1-19, 2011.

ROSS, M. H., & PAWLINA, W. Histologia: Texto e Atlas. Lippincott Williams & Wilkins, 6 ed., p.906, 2010.

SCHRIEBER R., & GAREIS, H. Gelatine handbook: theory and industry practice. Hardcover. 348p, 2007.

SHIMOKOMAKI, M., DUANCE, V. C.; BAILEY, A. J. Identification of two further collagenous fraction from cartilage. **Bioscience Reports**, v. 1, p. 561-570, 1981.

SHIMOKOMAKI, M.; OLIVO, R.; TERRA, N.N.; FRANCO, B.D.G.M. Atualidades em Ciência e Tecnologia de Carnes. São Paulo: Varela, 236p, 2006.

SILVA, R. A. Cunicultura. Secretaria de Estado da Agricultura e do Abastecimento, 2017. Disponível em:
<http://www.agricultura.pr.gov.br/sites/default/arquivos_restritos/files/qas/5863/cunicultura_25_out_2017.pdf>. Acesso em: 10 dezembro 2019.

SILVA, T. F., & PENNA, A. L. B. Colágeno: Características químicas e propriedades funcionais. **Revista Instituto Adolfo Lutz**. São Paulo, v. 71 (3), p. 530-539, 2012.

- SINGH, P., BENJAKUL, S., MAQSOOD, S., KISHIMURA, H. Isolation and characterization of collagen extracted from the skin of striped catfish (*Pangasianodon hypophthalmus*). **Food Chemistry**, v.124, p.97- 105, 2011.
- TAN, Y., & CHANG, S.K.C. Isolation and Characterization of Collagen Extracted from Channel Catfish (*Ictalurus punctatus*) Skin. **Food Chemistry**, 242, 147-155, 2017.
- TORNBERG, E. Effects of heat on meat proteins – Implications on Structure and Quality of meat products. **Meat Science**, v.70, p.493-508, 2005.
- VON DER MARK, K. Localization of collagen types in tissues. **International Review of Connective Tissue Research**, v. 9, p. 265-324, 1981.
- WANG, J., PEI, X., LIU, H., ZHOU, D. Extraction and characterization of acid-soluble and pepsin-soluble collagen from skin of loach (*Misgurnus anguillicaudatus*), **International Journal of Biological Macromolecules**, v.106, p.544-550, 2018.
- WANG, L., LIANG, Q., CHEN, T., WANG, Z., XU, J., MA, H. Characterization of collagen from the skin of Amur sturgeon (*Apenser schrenckii*). **Food Hydrocolloid**.v.38, p.104-109, 2014.
- XICCATO, G., TROCINO, A., VERGA, M., FERRANTE, V. Influence de l'effectif et de la densité par cage sur les performances productives, la qualité bouchère et le comportement chez le lapin. **Journées De La Recherche Cunicole**, v.8, p. 59-62, 1999.
- XIONG, X., GHOSH, R., HILLER, E. A new procedure for rapid, high yield purification of type I collagen for tissue engineering. **Process Biochem**, v.44, p.1200–1212, 2009.
- 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**, p. 261- 278, 2011.
- ZHANG, Q., WANG, Q., LV, S., LU, J., JIANG, S., REGENSTEIN, J.M., LIN, L. Comparison of collagen and gelatin extracted from the skins of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) and channel catfish (*Ictalurus punctatus*). **Food Bioscience**, v.13, p. 41-48, 2016.

ZHOU, C., LI, Y., YU, X., YANG, H., MA, H., YAGOUB, A. E. A., CHENG, Y., HU, J., OTU, P. N. Y. Extraction and characterization of chicken feet soluble collagen. **LWT-Food Science and Technology**, v.74, p.145-153, 2016.