



EXTRAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DO PÓ DE COLAGENO OBTIDO A PARTIR DE RESÍDUOS (PELE E NADADEIRAS) DE TILÁPIA

Admir Sedy Santos Alves^{1,a}; José William de Lima Souza²; Laedson Eneas Cavalcante^{3,4}; Dr^a. Glauciane Danusa Coelho⁴; Dr^a Norma Maria Lima⁴; Dr. Marcus Vinicius Lia Fook⁵

¹Pós Graduação em Engenharia Química. Universidade Federal de Alagoas – UFAL;

²Pós Graduação em Ciência e Engenharia dos Materiais. Universidade Federal de Campina Grande – UFCG.

³Graduando em Engenharia de Biotecnologia e Bioprocessos. Universidade Federal de Campina Grande – CDSA-UFCG.

⁴Unidade Acadêmica de Engenharia de Biotecnologia e Bioprocessos, CDSA-UFCG.

⁵Unidade Acadêmica de Engenharia dos Materiais. Universidade Federal de Campina Grande – UFCG.

^aRua Doutor José Maria Correia das Neves- Edifício Professor Ulysses Braga-109- Ap 201 Maceió-AL(57072-970) . sedy_ws@hotmail.com

RESUMO

O beneficiamento da tilápia gera subprodutos que são dispostos no ambiente sem qualquer tipo de tratamento. A produção do colágeno e hidrolisados a partir dos subprodutos do beneficiamento de peixes vem mudando esse cenário, visto que apresentam propriedades emulsificantes, agentes espumantes, estabilizantes coloidais, películas biodegradáveis, agentes microencapsulantes, com a tendência de substituir o material sintético, pelo natural com uma bioatividade e biocompatibilidade para aplicações médicas. No método de extração, ácido-base, os resíduos foram tratados utilizando soluções de: NaCl (0,8M), e diferentes concentrações de NaOH (0,05M; 0,1M; 0,2M) e ácido acético (0,05M), visando o desacoplamento do colágeno. Foram feitos cálculos para determinar o rendimento de colágeno em relação à matéria-prima, obtendo maior rendimento de 12,68% com a concentração 0,1 M de NaOH, nas concentrações mais baixas e altas ocorreu variação no rendimento. A caracterização morfológica foi realizada por análise em Microscopia Ótica (MO) e Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) e as caracterizações químicas pela técnica de Energia Dispersiva de Raios-X (EDS) e Espectroscopia no Infravermelho com transformada de Fourier (FTIR). Nos resultados de MO e MEV obtiveram-se detalhes micrométricos de estrutura, da topografia e da superfície das partículas de colágeno, com semelhanças morfológicas com outros polímeros naturais. Na análise de EDS demonstrou os percentuais dos elementos químicos esperados tipicamente para polímeros orgânicos. O ensaio de FTIR comprovou por meio das bandas características relatadas na literatura referente as ligações químicas formando grupamentos entre tais elementos relatados no EDS.

Palavras-Chave: Colágeno, Sustentabilidade, Subprodutos.

EXTRACTION AND CHARACTERIZATION OF COLLAGEN POWDER OBTAINED FROM WASTE (SKIN AND NADADE) OF TILÁPIA



ABSTRACT

Beneficiation of tilapia produce by-products that are arranged in the environment without treatment. Production of collagen and hydrolyzates from these by-products of fish processing has changed this scenario, due emulsifying properties, foaming agents, colloidal stabilizers, biodegradable films, microencapsulating agents with tendency to substitute synthetic material for natural with a bioactivity and biocompatibility for medical applications. In the acid-base extraction method, residues were treated using solutions of: NaCl (0.8M), and different concentrations of NaOH (0.05M; 0.1M; 0.2M) and acetic acid (0.05M), aiming at the decoupling of collagen. Calculations were made to determine the collagen yield relative to the raw material, obtaining a higher yield of 12.68% with the concentration 0.1 M of NaOH, in lower and higher concentrations, variation in yield occurred. Morphological characterization was performed by optical microscopy (OM) and scanning electron microscopy (SEM) and chemical characterization by X-ray Dispersive Energy (EDS) technique and Fourier Transform Infrared Spectroscopy (FTIR). In the results of MO and SEM were obtained micrometric details of structure, topography and surface of collagen particles, with morphological similarities with other natural polymers In the EDS analysis it was shown the percentages of the expected chemical elements typically for organic polymers. FTIR assay showed through bands characteristics reported in literature on chemical bonds forming clusters between such elements reported in the EDS.

Keywords: Collagen, Sustainability, By-products.

INTRODUÇÃO

O Brasil detém a maior quantidade de água doce com potencial para aquicultura continental no mundo, além de possuir uma extensão territorial mais de 8.500 km de faixa costeira, abrangendo uma área superior a 3.5 milhões de km² de Zona Econômica Exclusiva (1).

A apicultura nas regiões brasileiras é praticada em vários tipos de sistemas de cultivo em que o camarão e as tilápias são os mais cultivados (2). O cultivo de tilápia tem ganhado importância devido à alta produção obtida em gaiolas flutuantes instaladas em reservatórios (3).

Várias cidades do Cariri Paraibano tais como Camalaú, Congo e Sumé, têm alcançado o incremento na renda de famílias de pescadores, por meio do beneficiamento de peixes como a tilápia. Sabe-se que o processo de filetagem pode gerar até 70% de resíduo, que por não ter valor monetário é disposto no ambiente de forma inadequada causando o mau cheiro e atração de insetos, o que confere riscos à saúde pública dos ribeirinhos (4). Nesse sentido, o desenvolvimento de tecnologia para a extração de colágeno a partir de resíduos de tilápia pode ser uma atividade que pode gerar trabalho e renda, considerando que os resíduos de peixe são encontrados com facilidade nas cidades supracitadas e as técnicas empregadas para a extração do colágeno são relativamente simples, podendo deste modo



agregar valor aos subprodutos do pescado e conseqüentemente o desenvolvimento dessas regiões.

Em busca de alternativas viáveis para aproveitar rejeitos de pescados tem sido verificado na literatura a produção de hidrolisados proteicos e extração de colágeno e gelatina, devido a tendência de utilização destas proteínas na substituição aos agentes sintéticos nos mais diversos processos industriais, permitindo maior valorização dos subprodutos aumentando o faturamento destes e contribuindo para uma produção mais limpa e sustentável (5); (6); (7).

Neste trabalho avaliou-se o efeito da concentração de soluções NaOH, bem como o tempo de imersão dos resíduos de tilápia (pele e nadadeiras) nessa solução, na obtenção do colágeno e caracterizou-se o colágeno obtido.

METODOLOGIA

Os resíduos da tilápia (pele e nadadeiras) foram obtidos no mercado público de Sumé e passaram por um processo de descarte e lavagem em água corrente e foram conservados em geladeira até o início do tratamento. O processo de extração e análise foram realizados nos laboratórios de Microbiologia e de Química do (CDSA UFCG) no Campus de Sumé e no Laboratório de Avaliação de Desenvolvimento de Biomateriais do Nordeste (CERTBIO-UFCG).

Pré-tratamento e Extração do colágeno pelo método de Ácido-Base:

Em cada ensaio realizado foram utilizadas 100g de resíduos de tilápia (pele e nadadeiras). A extração foi realizada de acordo com a metodologia descrita (8), com a modificação das concentrações das soluções de NaOH.

O pré-tratamento consistiu em lavagem dos resíduos em água potável corrente, seguida de banho em solução de NaCl (0,8M) para remoção do excesso de água na pele.

Para a extração do colágeno foram utilizadas soluções de NaOH nas concentrações de 0,05M; 0,1M; 0,2M por três diferentes períodos de tempo de imersão (30min;40min;50min). As soluções de NaOH foram utilizadas para remoção da gordura na pele. O efeito do tempo de imersão em diferentes soluções de NaOH foi avaliado por meio de um planejamento fatorial 2^2 , com 3 (três) repetições no ponto central, totalizando 7 (sete) ensaios. Os ensaios 1 a 4 foram realizados em duplicata. O processo foi finalizado com banho em solução de ácido acético (0,05M) para o processo de desacoplamento ou quebra



da cadeia que compõe o colágeno. Após os tratamentos os extratos obtidos foram filtrados em papel de filtro, congelados e liofilizados.

Ao final dos ensaios os sólidos foram separados por meio de filtração em papel de filtro utilizando uma bomba de vácuo e o sobrenadante foi congelado e liofilizado para determinação da massa seca de colágeno obtida e posterior caracterização.

Avaliações do Rendimento

O cálculo do rendimento das extrações foi realizado a partir da relação entre a massa do colágeno seco e a massa da matéria-prima úmida de acordo com a Equação 1:

$$\text{Rendimento} = \frac{\text{Massa do colágeno}}{\text{Massa da matéria prima}} \times 100 \quad (1)$$

Microscopia Ótica (MO)

A microscopia ótica consiste em uma técnica em que a luz gerada por uma fonte halogênica é dispersa ao longo do canhão e condensada por meio de lentes condensadoras e óticas até chegar à lente final que reflete e incide sobre a amostra, e o sinal gerado por essa luz é captado por uma câmera direcionada paralelamente ao feixe ótico, dessa forma as imagens são geradas e capturas em um computador, para serem analisadas (9)

As análises foram conduzidas em um microscópio ótico (Hirox modelo KH-1300) acoplado a uma estação de captura e tratamento de imagens que utiliza o software 2D Measure.

Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

A MEV fundamenta-se na interação eletroquímica da amostra. Sendo que um filamento de tungstênio gera uma corrente de elétrons de 15kV, que é irradiada na direção da coluna que contém as lentes condensadoras. Estas condensam e demagnificam o feixe de elétrons para um diâmetro bem pequeno. Ao interagir com a amostra os raios excitam os elétrons de valências, e estes tendem a emitir um sinal devido a movimentos característicos. Esse sinal é captado pelo detector e transferido para o computador na forma de imagem para ser analisada posteriormente (10).



Nesse trabalho foi utilizado um microscópio eletrônico (Hitachi com modelo TM-1000) acoplado a uma estação de captura e tratamento de imagens, utilizando o software TM1000 com faixa de magnificação de 20 a 110.000X.

Espectroscopia no Infravermelho com transformada de Fourier (FTIR)

As análises foram conduzidas no Laboratório de Avaliação de Desenvolvimento de Biomateriais do Nordeste (CERTBIO-UFCG) utilizando espectrômetro (Perkin Elmer modelo Spectrum 400 Series) e o software Spectrum Search Plus for Spectrum V6. Esta técnica baseia – se na incidência de um laser infravermelho sobre a amostra. Desse modo, as ligações formadas pelos elementos químicos que compõem a amostra vibram e rotacionam em diferentes comprimentos de onda, de modo que permite medir o comprimento de ondas geradas. Diferentes comprimentos de onda indicam diferentes agrupamentos químicos, visto que estes apresentam frequências específicas de vibração, dessa forma, quantifica-se uma propriedade física de absorção ou de transmissão. Essa análise foi realizada para confirmar se o material obtido trata-se realmente de colágeno.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Extração de colágeno pelo Método de Ácido-Base

Aplicando planejamento fatorial 2^2 verificou-se que os maiores rendimento de colágeno foram obtidos a partir dos pontos centrais (0,1 M e 40 min) com rendimento médio de 12,49%, seguido dos ensaios 3 (0,05 M e 50 min) e 1 (0,05 M e 30 min) com rendimento 12,26% e 12,18%, respectivamente. Os menores rendimentos foram de 10,12% e 10,22% obtido a partir dos ensaios 2 (0,2 M e 30 min) e 4, (0,2 M e 50 min) respectivamente. As maiores concentrações de NaOH produziram os menores rendimentos em colágeno. As concentrações mais elevadas da solução alcalina podem resultar em um aumento da hidrólise do colágeno ou até mesmo em uma transformação parcial, embora pequena, do colágeno em aminoácidos, o que pode ter reduzido o rendimento do colágeno (11).

As análises de MO, MEV/EDS e FT-IR foram realizadas em 5 (cinco) amostras do total de 11 (onze) amostras obtidas. No entanto, como os resultados foram similares em todas as análises realizadas foi tomada como referência a amostra que apresentou maior rendimento na extração de colágeno, amostra referente a aplicação de solução de NaOH a 0,1M durante 40 min de imersão.



Microscopia Ótica (MO)

A análise das fotomicrografias óticas (Figura 1) permitiu a obtenção da topografia de superfície, do tamanho e do formato das partículas do colágeno proveniente dos resíduos de tilápia (pele e nadadeiras). Estes elementos são fatores preponderantes para o processamento posterior dessas partículas para uso como biomaterial, seja qual for a aplicação.

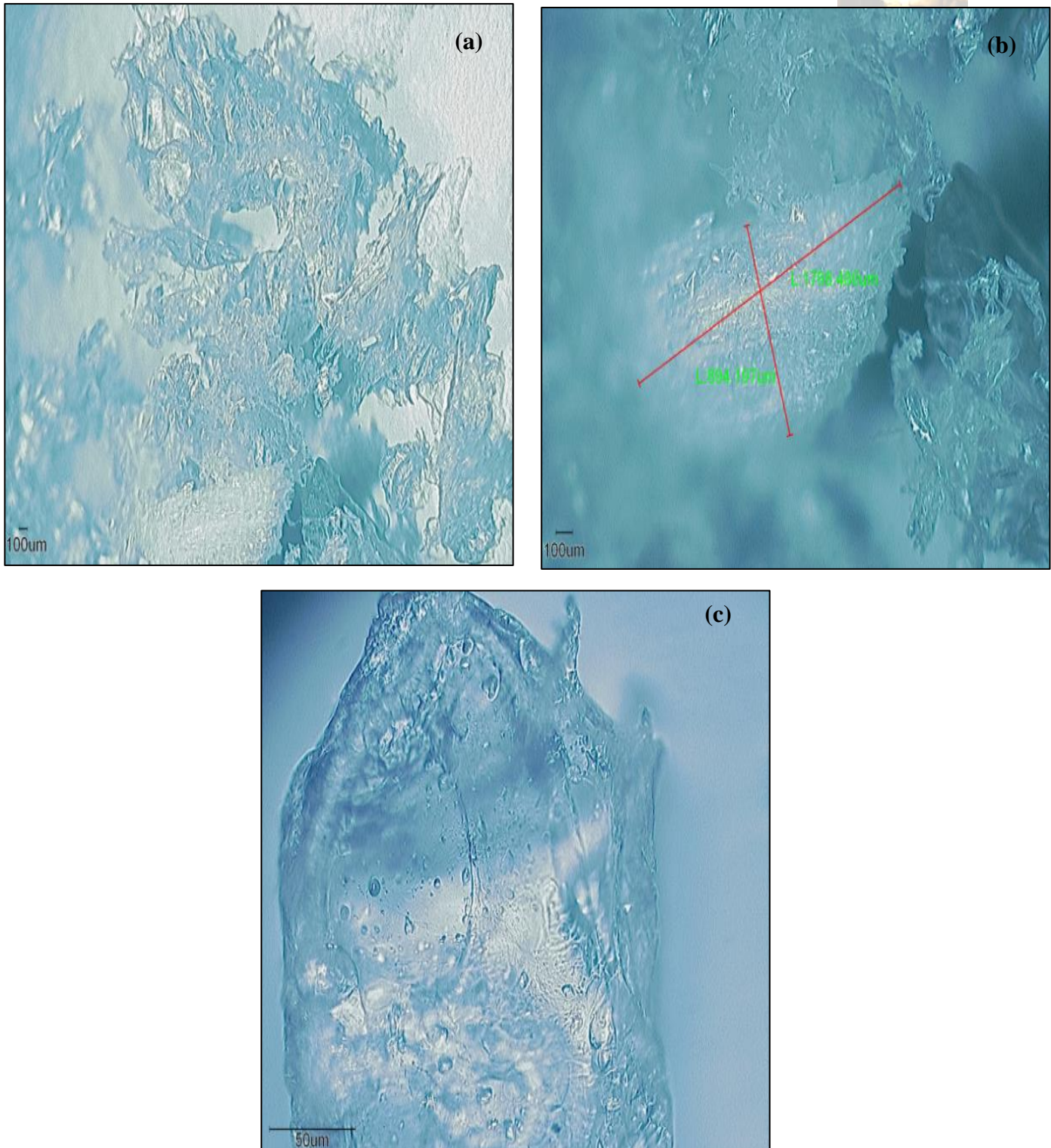


FIGURA 1 – (a) Partículas do colágeno obtido com ampliação de 50X; (b) Medidas com ampliação de 100X; (c) Morfologia aproximada com um aumento de 1050X da partícula de colágeno medida e observada em (b).



Nas micrografias (Figura 1a, 1b e 1c) observou-se que o colágeno obtido é composto por partículas de cerca 1,3 μm de comprimento e com formatos irregulares. Ainda, verifica-se na Figura 1 que o colágeno dispõe de micro poros na superfície, o que possivelmente caracterize esse pó de colágeno como hidrofílico, e o assemelha com a morfologia de outros polímeros de origem natural como a quitosana. Essas características facilitam, posteriormente, a solubilidade do pó de colágeno para aplicação na forma de gel, creme, membrana e outros (12).

As características observadas nas micrografias do pó de colágeno obtidas colaboram com o estudo anterior (13) em que foi observado que há retenção de moléculas de água pelas partículas de colágeno. Isso ocorre devido à presença de grupos polares reativos presentes na molécula de colágeno, os quais possibilitam a interação com as moléculas de água (14).

Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) e Espectroscopia por energia dispersiva de Raios-x (EDS)

A observação da morfologia das partículas do colágeno proveniente de resíduos de tilápia confirma a similaridade e concordância com as partículas de colágeno citado na análise de MO, que apresentam característica própria de material hidrofílico.

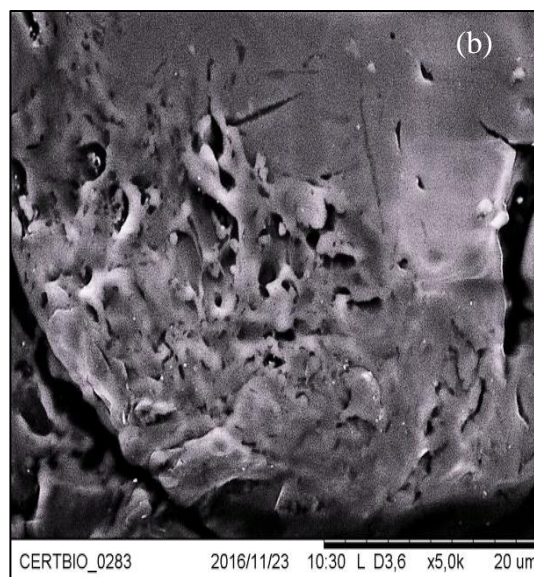
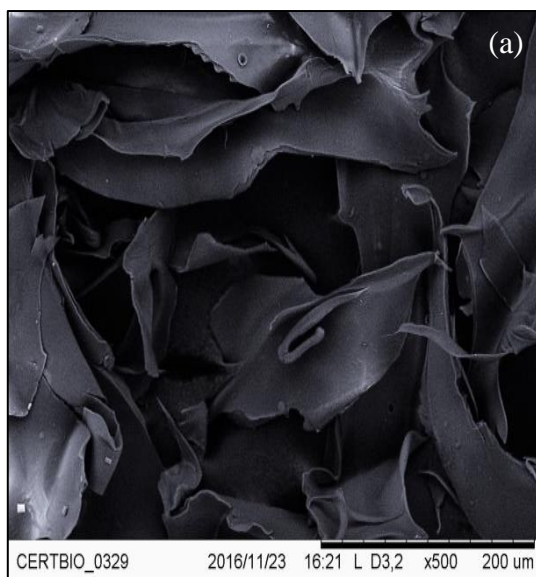
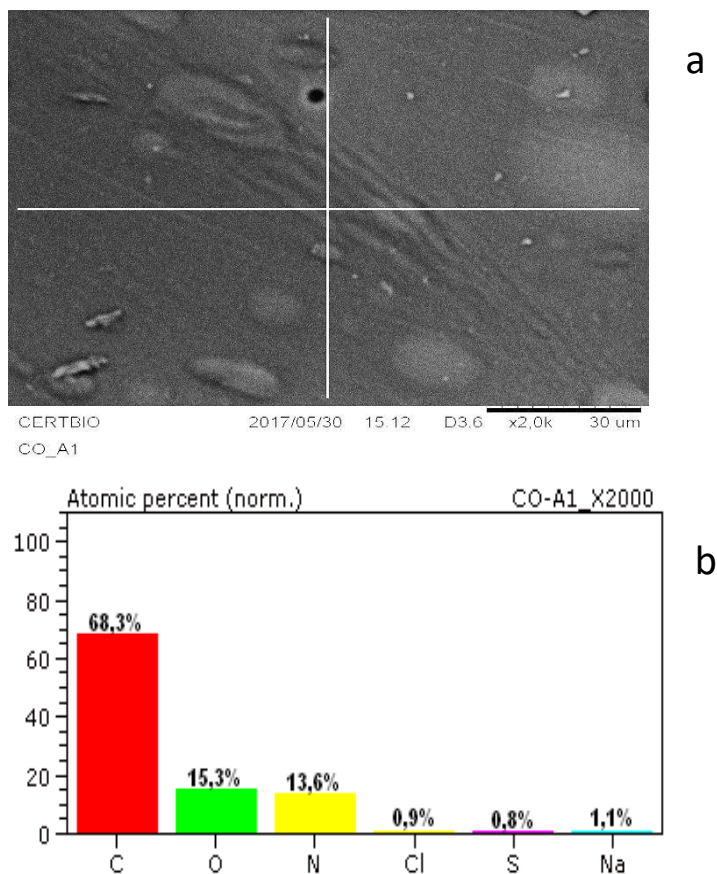




FIGURA 2 – (a) Fibras do colágeno observadas em MEV com uma magnificação de 500X; (b) Aproximação de uma dessas partículas com uma magnificação de 5000X.

A partir micrografia obtida por MEV (Figura 2 b) foi observada a estrutura microporosa do colágeno. A superfície apresenta-se lisa em alguns pontos e rugosa em outros. Esses dados estão de acordo com estudo em que foi demonstrada a remoção de proteínas não colagenosas e de materiais inorgânicos inicialmente presentes na amostra (15). Ainda, estudos apontaram também que a amostra apresentou morfologia de superfície de folha regular com manta filamentosa e natureza fibrilar, típicos de colágeno tipo I, o que acarreta uma alta capacidade de absorção de água (16).

Na técnica de EDS, que é acoplada à análise por MEV, marcou-se um ponto no centro da partícula de colágeno (Figura 3a). Os elementos químicos que estão presentes no centro dessa partícula de colágeno avaliada estão apresentados na Figura 3b.



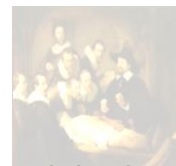


FIGURA 3 – Micrografia pontual da partícula do colágeno, com o percentual de elementos químicos presentes.

Os percentuais de Cloro (Cl) e de Sódio (Na), provavelmente, são resíduos do Cloreto de Sódio (NaCl) utilizado durante o processo de quebra e desacoplamento do colágeno. Com relação aos outros elementos, são típicos de moléculas orgânicas de colágeno no processo de extração.

Espectroscopia de Infravermelho com transformada de Fourier (FTIR)

A partir dessa técnica foi possível plotar a curva e identificar as ligações químicas presentes na amostra de colágeno estudada.

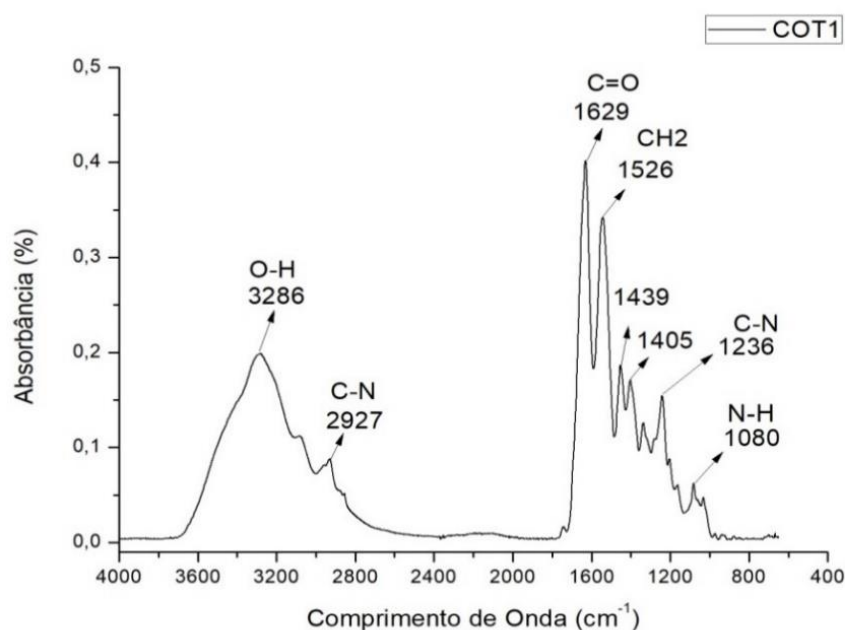


FIGURA 4 –
Curva de FTIR

realizada no pó de colágeno, apresentando as bandas com os respectivos grupos químicos.

A banda relativa ao estiramento O-H ocorre em geral, aproximadamente, em torno de 3286 cm^{-1} (17); (18); (19). Uma banda que ocorreu em 2927 cm^{-1} , está de acordo com (20), que diz que a posição da banda relativa ao grupo amina ocorreu em 2929 cm^{-1} , relacionada ao estiramento assimétrico de grupos CH_2 . Outra banda típica ocorreu em aproximadamente 1629 cm^{-1} e que de acordo com (21), refere-se à banda relativa à Amida I, com frequências



vibracionais características no intervalo de 1600-1700 cm^{-1} , foi observada em 1658 cm^{-1} e está associada ao estiramento de grupos carbonílicos ao longo da estrutura polipeptídica e representa um marcador sensível da estrutura secundária da proteína. Essa observação confirma que a formação de ligação de hidrogênio entre estiramento de grupos N-H (posição X) e grupos C=O (Glicina) do quarto resíduo é responsável pela iniciação da tripla hélice. A banda relativa à amida II, característica no intervalo de 1515-1570 cm^{-1} , foi observada em 1550 cm^{-1} e está associada à deformação de grupos N-H acoplado com estiramento de grupos C-N (22).

Uma banda em 1439 cm^{-1} ocorreu para o pó de colágeno analisado, o que segundo (23), esta banda observada está relacionada com deformação de grupos C-H presentes no anel pirrolidínico da prolina e da hidroxiprolina. Foi observada uma banda de absorção em 1236 cm^{-1} , correspondente à amida III, que está associada à deformação angular de grupos N-H acoplado com estiramento de grupos C-N (24).

Dessa forma, de acordo com as curvas obtidas foi possível identificar bandas com os respectivos estiramentos e vibrações típicas entre o pó do colágeno em relação aos grupamentos químicos orgânicos que o compõe.

CONCLUSÃO

Esse estudo demonstra que um método simples de baixo custo, como o base-ácido, pode ser aplicado para a eficiente extração de colágeno de resíduos de tilápia, agregando valor a um produto que anteriormente seria descartado proporcionando problemas ambientais.

O colágeno obtido apresentou características que evidenciam a remoção de proteínas não colagenosas e de materiais inorgânicos inicialmente presentes na amostra e também uma superfície de folha regular com manta filamentosa e natureza fibrilar, típicos de colágeno tipo I.

Ainda, as características físico-químicas e morfológicas verificadas são típicas de uma proteína de origem animal com propriedades poliméricas, que pode ser empregada para diversas aplicações como a geração de biomaterial.



REFERÊNCIAS

- 1 OLIVEIRA RO. **Panorama da Aquicultura no Brasil: a prática com foco na sustentabilidade**. Revinter - Revista Intertox de Toxicologia, Risco Ambiental e Sociedade, vol.2, nº1, Fev, 2009. Disponível em: <<http://www.intertox.com.br>>. Acesso em: 20 abr. 2015.
- 2 MINISTÉRIO DA PESCA E AQUICULTURA (MPA). **Produção Pesqueira e Aquícola-Estatística 2008-2010**. 60 p. 2011.
- 3 SAMPAIO LA. Brazilian Aquaculture Update. **World Aquaculture Magazine**, P. 35-41. 2010.
- 4 PAIVA IAM, ALVES ASS, RODRIGUES JSL, SOUZA LJW, COELHO GD. RESÍDUOS DE PESCADO GERADO PELO PROCESSO DE FILETAGEM DA TILÁPIA. *In*: 8º Simpósio Internacional Sobre Gerenciamento de Resíduos em Universidades. 8th International Symposium on Residue Management in Universities UFCG. **GESTÃO INTEGRADA DE RESÍDUOS: UNIVERSIDADE & COMUNIDADE 2017**.
- 5 BUENO MC, ALVIM DI, KOBERSTEIN TCR, PORTELLA CM, GROSSO C. Produção de gelatina de pele de tilápia e sua utilização para obtenção de micropartículas contendo óleo de salmão. **Brazilian Journal of Food Technology** Campinas, v. 14, n. 1, p. 65-73, jan./mar. 2011.
- 6 PRESTES RC. Colágeno e Seus Derivados: Características e Aplicações em Produtos Carneos. 10 f. **UNOPAR Científica**. Ciências Biológicas e da Saúde 2013, 15(1):65-74.
- 7 SILVA TF, PENNA AL. B.Colágeno: Características químicas e propriedades funcionais **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, v 7.n 3.2012.
- 8 MONTERO P, GÓMEZ-GUILLÉN MC. Extracting conditions for megrim (*Lepidorhombus bosci*) skin collagen affect functional properties of the resulting gelatin. *Journal of Food Science*, v. 65, n. 3, p. 434-438, 2000.
- 9 ATTIAS M, SILVA N. *Biologia Celular I*. 4ª Edição ed. Rio de Janeiro: Fundação CECIERJ; 2010.
- 10 DEDAVID BA, GOMES CI, MACHADO G. **MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA - Aplicações e preparação de amostras**. Edição do CEMM - Centro de Microscopia e Microanálises do IDÉIAPUCRS ed. Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul: Porto Alegre 2007.
- 11 BASSOS TR, URNAU RM, BRANDALIZE C, SIMÕES MR. Extração e Caracterização de Colágeno Obtido de Peles do Processamento de Tilápia. **III Encontro Paranaense de Engenharia e Ciência** Universidade Estadual do Oeste do Paraná – UNIOESTE, Campus Toledo-PR. Out 2013.
- 12 SILVA MHP. Apostila de Biomateriais. **SlideShare**, Disponível em: <https://pt.slideshare.net/DuarteBClaudia/apostila-biomateriais>. 2014.
- 13 HOINACKI E. **Peles e couros: Origens, defeitos e industrialização**. 2ª. Edição. Porto Alegre: CFP Artes Gráficas d'Ávila Bertaso, 1989.
- 14 MORAES MC. **Produção de hidrolisados de colágeno visando diferentes aplicações tecnológicas**. Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Engenharia de Alimentos – Campinas - SP, 2012.
- 15 WANG L, LIANG Q, CHEN T, WANG Z, XI J, MAA H. Characterization of collagen from the skin of Amur sturgeon (*Acipenser schrenckii*). **Food Hydrocolloids**, v. 38, p. 104-109, 2014.



- 16 TAMILMOZHI S, VEERURA JA, ARUMUGAM M. Isolation and characterization of acid and pepsin-solubilized collagen from the skin of sailfish (*Istiophorus platypterus*). *Food Research International*, v. 54, n. 2, p. 1499-1505, 2013.
- 17 BASSLER GC, MORRIL TC, SILVERSTEIN RM. Identificação Espectrométrica de Compostos Orgânicos. 6. Ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2001. 550p.
- 18 COLTHUP NB, FATELEY WG, GRASSELLI JG. The Handbook of Infrared and Raman Characteristic Frequencies of Organic Molecules. Academic Press, 1991. 503p.
- 19 LAMPMAN GM, KRIZ GS, PAVIA DL. Introduction to spectroscopy. Thomson Brooks, 2001. 680p.
- 20 YU D, CHI CF, WANG B, DING GF, LI ZR. Characterization of acid- and pepsin-soluble collagens from spines and skulls of skipjack tuna (*Katsuwonus pelamis*). *Chinese Journal of Natural Medicines*, v. 12, n. 9, p. 712-720, 2014.
- 21 SINGH P, BENJAKUL S, MAQSOOD S, KISHIMURA H. Isolation and characterisation of collagen extracted from the skin of striped catfish (*Pangasianodon hypophthalmus*). **Food Chemistry**, v. 124, p. 97–105, 2011.
- 22 LIU X, JIANG Y, HE H, PING W. Hydrogen peroxide-induced degradation of type I collagen fibers of tilapia skin. **Food Structure**, v. 2, n. 1-2, p. 41-48, 2014.
- 23 VEERURAJ A, ARUMUGAM M, AJITHKUMAR T. BALASUBRAMANIAN T. Isolation and characterization of collagen from the outer skin of squid (*Doryteuthis singhalensis*). **Food Hydrocolloids**, v. 43, p. 708-716, 2015.
- 24 LI ZR, WANG B, CHI CF, ZHANG QH, GONG YD, TANG JJ, LUO HY, DING GF. Isolation and characterization of acid soluble collagens and pepsin soluble collagens from the skin and bone of Spanish mackerel (*Scomberomorus niphonius*). **Food Hydrocolloids**, v. 31, p. 103-113, 2013.